



## Short note [Nota corta]

EVALUACIÓN DE LOS PATRONES DE FERMENTACIÓN *IN VITRO* Y PRODUCCIÓN DE METANO DE VAINA DE MEZQUITE (*Prosopis spp.*)†[EVALUATION OF *IN VITRO* FERMENTATION PATTERNS AND METHANE PRODUCTION OF MESQUITE PODS (*Prosopis spp.*)]

Juan Carlos Ángeles-Hernández<sup>1</sup>, Augusto Lizarazo Chaparro<sup>2</sup>,  
José Manuel Elizalde Téllez<sup>1</sup>, Alfonso Juventino Chay-Canul<sup>3</sup>,  
Verónica Rodríguez-Guerrero<sup>4</sup>, Joaquín Castro-Montoya<sup>5</sup>  
and Oscar Enrique del Razo-Rodríguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Avenida Universidad km 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, C.P. 43600, México. Email: [juan\\_angeles@uaeh.edu.mx](mailto:juan_angeles@uaeh.edu.mx); [oscare@uaeh.edu.mx](mailto:oscare@uaeh.edu.mx)

<sup>2</sup>Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal, Avenida Cruz Blanca No. 486, San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, C.P. 14500, CDMX, México. Email: [aclizarazoc@gmail.com](mailto:aclizarazoc@gmail.com)

<sup>3</sup>División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, km 25 Carretera Villahermosa-Teapa, Villahermosa, Tabasco, México. Email: [aljuch@hotmail.com](mailto:aljuch@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, CDMX, México. Email: [verogue1678@gmail.com](mailto:verogue1678@gmail.com)

<sup>5</sup>Escuela de Posgrado y Educación Continua. Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador, El Salvador. Email: [joaquin.montoya@ues.edu.sv](mailto:joaquin.montoya@ues.edu.sv)

\* Corresponding author

## SUMMARY

**Background.** Mesquite is a shrubby legume that dominates the vegetation of arid regions with multiple benefits in controlling erosive process, improving micrometeorology, and as feed source for livestock species. In addition, mesquite pods contain secondary components that could represent an option to mitigate emissions of enteric methane in ruminants. **Objective.** To evaluate *in vitro* fermentation patterns and methane production of mesquite pods (*Prosopis spp.*) in the arid ecoregion of the State of Hidalgo. **Methodology.** Mesquite pod samples were obtained from four municipalities in the arid ecoregion of the state of Hidalgo: Actopan (ACT), Tula de Allende (TUL), San Salvador (SAL) and Zimapán (ZIM). *In vitro* fermentation of the mesquite pods was carried out during 72 h to 39 °C in a culture medium with ruminal bacteria and mineral solutions. The fractional gas volume (Vf), cumulated gas volume (Va), maximum volume (V), gas production rate (S) and lag time (L) were calculated. The volume of methane was quantified by displacement of a NaOH 2N solution. **Results.** Some chemical composition characteristics of the mesquite pods were different between municipalities. V showed significant differences between localities ( $p \leq 0.05$ ), with mesquite pods collected in SAL showing the highest values (163.2 mL g<sup>-1</sup> MS). A municipality x time interaction was observed for Vf ( $p \leq 0.05$ ) and differences between municipalities were observed. The values of volume partial of CH<sub>4</sub> observed at 24 hours were different between collection sites ( $p \leq 0.05$ ), with higher emission values observed in mesquite pods collected in SAL (16.3 mL/g MS) and ACT (17.3 mL/g MS). **Conclusion.** The results of the current study provide evidence of differences of *in vitro* fermentation patterns and methane emissions from the mesquite pods regarding to origin place. **Implications.** These results should be considered in the design and implementation of future nutritional and greenhouse gas mitigation strategies.

**Key words:** Ruminal fermentation; ruminants; rumen bacteria; secondary components; ruminal degradation.

† Submitted September 14, 2021 – Accepted March 14, 2022. <http://doi.org/10.56369/tsaes.3971>



## RESUMEN

**Antecedentes.** El mezquite es una leguminosa arbustiva la cual predomina en regiones áridas con múltiples beneficios en el control de procesos erosivos, mejora de la micrometeorología y representa una fuente de alimento en especies pecuarias. Además, las vainas de mezquite contienen componentes secundarios los cuales podrían representar una opción como estrategia de mitigación de emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) entérico en rumiantes. **Objetivo.** Evaluar los patrones de fermentación *in vitro* y producción de CH<sub>4</sub> de vaina de Mezquite (*Prosopis spp.*) en la ecorregión árida del Estado de Hidalgo. **Metodología.** Las muestras de vaina de mezquite fueron obtenidas de cuatro municipios de la ecorregión árida del estado de Hidalgo: Actopan (ACT), Tula de Allende (TUL), San Salvador (SAL) y Zimapán (ZIM). La fermentación *in vitro* de las vainas de mezquite se llevó a cabo durante 72 h a 39 °C en un medio de cultivo con bacterias ruminales y soluciones minerales. Los cálculos realizados fueron para volumen fraccional de gas (Vf), volumen acumulado de gas (Va), volumen máximo (V), tasa de producción de gas (S) y tiempo de retardo (L). El volumen de CH<sub>4</sub> fue cuantificado por desplazamiento de una solución de NaOH 2N. **Resultados.** Algunas de las características de composición química de la vaina de mezquite fueron numéricamente diferentes entre municipios. V mostró diferencias significativas entre localidades ( $p \leq 0.05$ ), siendo las vainas de mezquite colectadas en SAL las que presentaron los valores más altos (163.2 mL g<sup>-1</sup> MS). Una interacción municipio x tiempo fue observada para Vf ( $p \leq 0.05$ ), con diferencias entre sitios de colecta a las 4, 24 y 32 horas. El volumen parcial de CH<sub>4</sub> registrado a las 24 horas fue diferente entre municipios ( $p \leq 0.05$ ), con valores superiores de emisión observados en vainas de mezquite colectadas en SAL (16.3 mL/g MS) y ACT (17.3 mL/g MS). **Conclusiones.** Los resultados del presente estudio proporcionan evidencia de las diferencias en los patrones de fermentación *in vitro* y emisiones de CH<sub>4</sub> de la vaina de mezquite en función del municipio. **Implicaciones.** Estos resultados deben considerarse en el diseño e implementación de futuras estrategias nutricionales y de mitigación de gases de efecto invernadero. **Palabras clave:** Fermentación ruminal; rumiantes; bacterias ruminales; componentes secundarios; degradación ruminal.

## INTRODUCCIÓN

Las regiones áridas y semiáridas representan más del 30 % de la superficie terrestre, siendo la ganadería una de las actividades productivas principales de esas regiones (Saco *et al.*, 2007). Aunque el desarrollo de la ganadería en regiones áridas manifiesta una elevada vulnerabilidad, alto riesgo y es desafiante en términos económicos, las actividades pecuarias en estas regiones son esenciales en la cadena alimentaria mundial y probablemente se vuelva más importante en el futuro debido al incremento en las demandas de alimento superiores al 70 % proyectadas para el año 2050 (Stewart, 2016).

En este sentido, las zonas áridas abarcan el 39 % de la superficie total del Estado de Hidalgo, abarcando 60 de sus 84 municipios. De acuerdo con Fernández-Badillo *et al.* (2016) la región árida hidalguense comprende 2 ecorregiones: el matorral central mexicano y el matorral de la meseta central, en las cuales la vegetación está integrada por matorral xerófilo, bosque caducifolio, áreas de bosque espinoso y pastizal. Las leguminosas arbustivas del género *Prosopis spp.* dominan la vegetación de estas regiones con beneficios múltiples en el control de procesos erosivos, mejora de la micrometeorología y como fuente de alimento de especies pecuarias (Patnaik *et al.*, 2017). Un estudio reciente señala que arbustivas del género *Prosopis spp.* podrían ser potencialmente establecidas en 83,437 hectáreas en el estado de Hidalgo, siendo San Salvador y Actopan los municipios que muestran mayor viabilidad de establecimiento de esta leguminosa, con base en sus condiciones agroecológicas (Palacios *et al.*, 2021).

Mezquite es el nombre común que se ha dado al género *Prosopis spp.* La biomasa de este árbol tiene potencial para mejorar la calidad de la dieta de los animales al proveer alimentos en la época seca (Armijo-Nájera *et al.*, 2019). Las vainas de mezquite son utilizadas en la nutrición animal ya que tienen una palatabilidad buena y son ricas en proteína (hasta 22 %) y energía (de 30 a 75 % de carbohidratos) (Ruiz-Nieto *et al.*, 2020), lo cual llevaría a una mejora en la digestibilidad y a una optimización del uso de la proteína y la actividad microbiana ruminal (Soltan *et al.*, 2012). Sin embargo, el valor nutricional y potencial utilización del mezquite en la nutrición animal dependen de factores como: etapa fenológica, especie, parte de la planta, región y condiciones agroclimáticas de crecimiento. La información relacionada con el potencial nutritivo de las vainas de mezquite con respecto a su origen geográfico es limitada, aunque existe evidencia de diferencias en la composición nutricional de esta leguminosa dependiendo de la región del mundo en el cual se encuentre (Ruiz-Nieto *et al.*, 2020).

Por otra parte, la agricultura aporta cerca del 14 al 18 % del total de emisiones anuales de gases de efecto invernadero, de las cuales 42 % se derivan de la actividad pecuaria, principalmente metano entérico (CH<sub>4</sub>; IPCC, 2014; Sejian *et al.*, 2015; Pelcastre *et al.*, 2020). La manipulación del manejo nutricional es una de las estrategias más efectivas para la mitigación de CH<sub>4</sub> entérico y reducción del impacto de los sistemas pecuarios en el calentamiento global. Las estrategias nutricionales de mitigación en rumiantes incluyen la suplementación con lípidos, manejo de la relación forraje:concentrado, inhibidores químicos y la

utilización de fitocomponentes (componentes secundarios) (Beauchemin *et al.*, 2020). Algunos estudios señalan que la vaina de mezquite, además de representar una fuente energética y proteica, es rica en componentes secundarios de interés en la nutrición animal, principalmente taninos, los cuales han demostrado tener efectos sobre la microbiota ruminal con una reducción en la producción de CH<sub>4</sub> entérico (Patnaik *et al.*, 2017; Ruiz-Nieto *et al.*, 2020; Ferrer *et al.*, 2021). El objetivo del presente trabajo es evaluar los patrones de fermentación *in vitro* y producción de CH<sub>4</sub> de vaina de Mezquite (*Prosopis spp.*) encontrado en la ecorregión árida del Estado de Hidalgo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El experimento se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), en Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México. Las muestras de vaina de mezquite fueron obtenidas de cuatro municipios de la ecorregión árida del estado de Hidalgo: Actopan (ACT), Tula de Allende (TUL), San Salvador (SAL) y Zimapán (ZIM). El material vegetativo fue colectado seco considerando la coloración amarillenta de la vaina, de acuerdo con Cerón-Ortiz *et al.* (2015). Cinco árboles fueron seleccionados y muestreados aleatoriamente para cada sitio de estudio, obteniéndose 1 kg de material vegetativo de cada árbol. El muestreo se llevó a cabo en el mes de julio de 2019 en todos los municipios, en los cuales la temperatura media anual promedio los 19.3 °C y la precipitación pluvial anual es de 389.3 mm (INEGI, 2017).

### Análisis de laboratorio

Las muestras de vaina de mezquite se secaron a 55 °C por 72 h, posteriormente se molieron a un tamaño de partícula de 1 mm y se analizaron en el laboratorio de análisis químicos para alimentos, en el Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Para la determinación de materia seca (MS), cenizas, proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), fibra cruda (FC) y extracto libre de nitrógeno (ELN), se utilizó el método AOAC (2005). La fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y lignina fueron determinadas por la técnica de Van Soest y Wine (1968). Adicionalmente, se calcularon los nutrientes digestibles totales (NDT) a partir de la materia orgánica (Lofgreen, 1953).

### Producción de gas

La fermentación *in vitro* se realizó utilizando la técnica de producción de gas propuesta por Theodorou *et al.* (1994). El medio de cultivo contenía 225 mL de solución amortiguadora [4 g de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (Meyer<sup>®</sup>) y 35 g de NaHCO<sub>3</sub> (Meyer<sup>®</sup>), en 1000 mL], 225 mL de solución macromineral [5.7 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Meyer<sup>®</sup>), 6.2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Meyer<sup>®</sup>) y 0.6 g de MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O (Sigma<sup>®</sup>), en 1000 mL], 100 mL de líquido ruminal y 450 mL de agua destilada, por cada 1000 mL. Además, se agregaron 100 µL de una solución micromineral [13.2 g de CaCl<sub>2</sub> • 2H<sub>2</sub>O (Sigma<sup>®</sup>), 10 g de MnCl • 4H<sub>2</sub>O (Sigma<sup>®</sup>), 1 g de CoCl • 6H<sub>2</sub>O (Meyer<sup>®</sup>) y 8 g de FeCl<sub>3</sub> (Meyer<sup>®</sup>), en 100 mL], 1.2 mL de resazurina al 0.1 % y una solución reductora [0.57 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 4 mL de NaOH 0.1 N, en 100 mL] a razón de 2 mL por cada 60 mL del medio. Los componentes se mezclaron en placa de calentamiento con agitador magnético y flujo constante de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 39 °C.

El líquido ruminal se obtuvo de dos ovejas con cánula en rumen (Suffolk x Rambouillet, 2 años), se filtró a través de tres capas de manta y se mantuvo a 39 °C hasta su uso. La alimentación de las ovejas consistió en heno de avena a libre acceso y 500 g d<sup>-1</sup> de alimento comercial con 15 % de PC. La colocación quirúrgica de las cánulas fue autorizada por el Comité Institucional de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la UAEH. Los cuidados antes y después de la cirugía se realizaron conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que establece las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (DOF, 2001).

Para la liberación de gas se usaron frascos de vidrio transparente (120 mL de capacidad y boca de 20 mm) en los cuales se depositó una muestra de 500 mg de sustrato (mezquite) en cada uno, además de 40 mL de medio de cultivo, con flujo constante de CO<sub>2</sub> por 15 s. El sellado hermético de cada frasco se realizó con un tapón de silicón y un casquillo de aluminio colocado con una engarzadora manual (Wheaton, E-Z Crimper, USA). La incubación se realizó a 39 °C en baño María (Thermo Scientific, 2864, USA) por 72 h. Tres frascos sin sustrato (blancos) se incubaron para medir el volumen de gas producido por el inóculo.

El volumen de gas se registró a las 2, 4, 6, 9, 24, 32, 48 y 72 horas de incubación por desplazamiento de agua (Ramirez-Bribiesca *et al.*, 2011), el cual fue corregido restando el promedio de gas producido por los blancos para obtener el volumen fraccional de gas (Vf; mL g<sup>-1</sup> MS). Adicionalmente, se calculó el volumen acumulado de gas (Va) en cada tiempo de medición, el cual fue utilizado para estimar las variables de la cinética de la producción de gas, utilizando el modelo propuesto por Schofield y Pell (1995):

$$Va = \frac{V}{1+e^{2-4S(t-L)}} \quad (1)$$

En donde: Va; volumen de gas al tiempo  $t$ ; V es el volumen máximo ( $\text{mL g}^{-1} \text{MS}$ ); S es la tasa de producción de gas ( $\text{h}^{-1}$ ) y L es el tiempo de retardo (h). Estos parámetros fueron estimados mediante un proceso iterativo de regresión no lineal utilizando el procedimiento NLIN de SAS® (SAS Institute Inc., 2012).

El volumen de  $\text{CH}_4$  se registró a las 24, 32, 48 y 72 h, utilizando el procedimiento descrito por Torres-Salado *et al.* (2018), para lo cual se incubaron tres biodigestores adicionales por tratamiento. Unos frascos trampa (viales serológicos transparentes de 120 mL de capacidad) se prepararon para capturar el  $\text{CO}_2$  del gas acumulado en los biodigestores. Los frascos trampa se llenaron totalmente con una solución de NaOH 2N (80 g en 1000 mL de agua destilada) y se sellaron herméticamente. Cada biodigestor se conectó con un frasco trampa mediante una manguera flexible de 45 cm de longitud (Taygon®, 2.38 mm de diámetro interno) con agujas hipodérmicas en los extremos (20 G X 32 mm), para permitir el ingreso del biogás al frasco trampa por diferencia de presión. Una aguja hipodérmica insertada en el tapón del frasco trampa se utilizó como válvula de escape de la solución. El volumen de  $\text{CH}_4$  se cuantificó midiendo el volumen de solución desplazada del frasco trampa al ingresar el biogás, considerando que el  $\text{CO}_2$  se solubiliza y queda capturado como  $\text{NaCO}_3$  (Yoo *et al.*, 2013).

### Análisis estadístico

El diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo fue utilizado en el presente experimento. Los datos de todas las variables se analizaron utilizando un modelo mixto con el procedimiento MIXED de SAS® (SAS Institute Inc., 2012), considerando en el modelo estadístico al sitio de colecta y tiempo de medición como efectos fijos y la unidad de fermentación (frasco) anidado dentro de corrida como efecto aleatorio. Las medias de cuadrados mínimos se obtuvieron utilizando la función LSMEANS; para las variables en las cuales se obtuvieron pruebas de hipótesis significativas el análisis post-hoc se llevó a cabo utilizando la prueba de Tukey. El Criterio de Información Akaike y Criterio de Información Bayesiano fueron utilizados como criterios de bondad de ajuste para seleccionar la matriz de varianzas y covarianzas más adecuada a la estructura de los datos. Las matrices probadas fueron

modelo autorregresivo de orden 1 (TYPE=AR-1), simetría compuesta (TYPE=CS), Toeplitz (TYPE=TP) y modelo exponencial (TYPE=SP(POW)), siendo esta última matriz la que mostró el mejor ajuste. El nivel de significancia considerado fue de 0.05.

## RESULTADOS

### Composición nutricional

La Tabla 1 muestra la composición química de las vainas de mezquite en función de los municipios de muestreo en la ecorregión árida del estado de Hidalgo. En general, el contenido de MS, PC, EE, cenizas y FC fue numéricamente similar entre vainas de los cuatro municipios. Sin embargo, las vainas de TUL destacaron por su contenido mayor de NDT y FDN, mientras que las vainas de ZIM destacaron por su contenido más alto de FDA y lignina.

### Producción de gas

Los parámetros de la cinética de fermentación *in vitro* de las vainas de mezquite colectadas de cuatro municipios del estado de Hidalgo se presentan en la tabla 2. El valor de V mostró diferencias significativas entre localidades ( $p \leq 0.05$ ). Las vainas de mezquite colectadas en el municipio de SAL presentaron los valores más altos de V ( $163.2 \text{ mL g}^{-1} \text{MS}$ ), seguido por TUL ( $138.2 \text{ mL g}^{-1} \text{MS}$ ) y ACT ( $134.8 \text{ mL g}^{-1} \text{MS}$ ); las vainas de mezquite obtenidas del municipio de ZIM exhibieron el valor más bajo de V ( $114.5 \text{ mL g}^{-1} \text{MS}$ ). Las diferencias en los valores de S y L entre municipios no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

La Figura 1 muestra las medias de cuadrados mínimos y errores estándar del Vf de gas producido por la fermentación *in vitro* de las vainas de mezquite por municipio, a través de las 72 horas de incubación. En general, se observaron dos picos de producción de gas en muestras de los cuatro municipios, pero el análisis de perfiles permitió identificar una interacción municipio  $\times$  tiempo para la variable Vf ( $p \leq 0.05$ ), lo que significa que el patrón de fermentación fue diferente entre municipios. El primer pico ocurrió entre las 2 y 4 horas, pero fue más elevado con las muestras obtenidas en los municipios de SAL y TUL a las 4 horas de incubación. El segundo pico de producción de gas ocurrió a las 24 horas con las muestras de SAL y ACT, siendo más elevado para SAL respecto a los otros municipios; y a las 32 horas con las muestras de TUL y ZIM, siendo mayor para TUL.

**Tabla 1.** Composición química de la vaina de mezquite de acuerdo con el municipio de muestreo en la ecorregión árida del estado de Hidalgo, México (% MS).

Componente	Municipio			
	Actopan	San Salvador	Tula	Zimapán
Materia seca	95.8	96.7	96.9	96.5
Proteína cruda	10.3	10.2	10.3	11.5
Extracto etéreo	1.9	0.9	1.1	1.5
Cenizas	3.5	3.4	3.3	3.4
Fibra cruda	26.9	25.9	25.0	25.7
NDT	68.1	67.1	75.4	67.6
CHO	57.4	59.6	54.2	57.4
FDN	43.0	42.7	58.7	48.1
FDA	28.6	29.4	23.6	34.8
Lignina	6.3	6.5	5.6	7.6

NDT, Total de nutrientes digestibles; CHO, carbohidratos (extracto libre de nitrógeno); FDN, Fibra detergente neutra; FDA, Fibra detergente ácida.

**Tabla 2.** Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* de vainas de mezquite (*Prosopis spp.*) de cuatro municipios de la ecorregión árida del estado de Hidalgo, México.

Municipio	V	S	L
Actopan	134.8 <sup>b</sup>	0.025	-4.4
Tula	138.2 <sup>b</sup>	0.045	-3.2
San Salvador	163.2 <sup>a</sup>	0.040	-2.7
Zimapán	114.5 <sup>c</sup>	0.022	-4.2
EEM	6.1	0.011	1.2
Valor de P	0.005	0.47	0.72

V, volumen máximo (mL g<sup>-1</sup> MS); S, tasa de producción (h<sup>-1</sup>); L, tiempo de retardo (h). EEM; error estándar de la media.

<sup>abc</sup> Diferentes superíndices en la misma columna muestran diferencias significativas entre sitios (p≤0.05).

### Producción de metano

Los resultados de la producción *in vitro* de CH<sub>4</sub> con vaina de mezquite en función del municipio se muestran en la Tabla 3. El volumen total de CH<sub>4</sub> registrado entre las 24 y 72 horas de incubación no fue diferente entre municipios (p>0.05), siendo en promedio de 32.2 (±1.9) mL g<sup>-1</sup> MS. En general, la mayor producción de CH<sub>4</sub> ocurrió a las 24 horas con vainas de los cuatro municipios; sin embargo, el comportamiento de la producción de CH<sub>4</sub> fue diferente entre municipios a través del tiempo, ya que una interacción municipio × tiempo fue observada (p≤0.05). Es decir, que la proporción de CH<sub>4</sub> producido a las 24 horas representó el 51.5, 43.7, 35.8 y 39.1 % para las vainas de ACT, SAL, TUL y ZIM, respectivamente.

## DISCUSIÓN

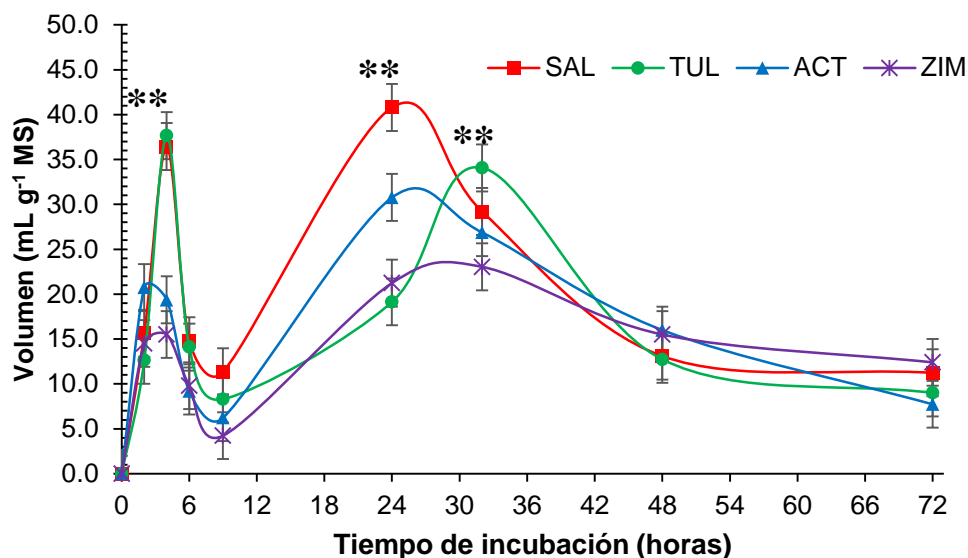
### Composición nutricional

En el presente estudio se evaluó el efecto del sitio de colecta de vaina de mezquite en su composición nutricional, sus parámetros de fermentación ruminal y la producción de CH<sub>4</sub>. El contenido de MS del presente estudio es similar a los reportados en estudios previos en México (85.5 %; Peña-Avelino *et al.*, 2014), Brasil (94.3 %; Almeida *et al.*, 2017) y Omán (93.0 %; Mahgoub *et al.*, 2005). Por su parte, Ruiz-Nieto *et al.* (2020) refieren una importante variabilidad de los constituyentes de esta leguminosa arbustiva, la cual se encuentra principalmente asociada con la región de origen, etapa fenológica y temporada de cosecha. Además, Geesing *et al.* (2000) refieren que algunas características del suelo, como pH y concentración de nitrógeno, afectan el crecimiento y propiedades del mezquite, por lo que las propiedades del suelo de los sitios de colecta deben considerarse en estudios posteriores.

El contenido de proteína de la vaina de mezquite en el presente trabajo es superior a los reportados en el norte de México. Peña-Avelino *et al.* (2014) refiere valores de PC entre 7.7 y 7.9 % en vainas de mezquite colectadas en San Luis Potosí, México. En el mismo estado de la república mexicana, García-López *et al.* (2019) evaluaron tres variedades de mezquite obteniendo niveles de PC entre 8.14 y 10.28 %. El promedio del contenido de PC en nuestro estudio fue de 10.58 ± 0.61 %, lo cual está dentro del rango (7.0 a 22.0 % PC) reportado por Ruiz-Nieto *et al.* (2020) en una extensiva y detallada revisión de literatura enfocada en el uso del mezquite como estrategia en la nutrición animal. Proporcionar al rumiante un alimento con un nivel de PC del 10 % significaría una mejora en su estatus nutricional, particularmente para aquellos

animales cuya dieta se basa en pastos nativos con contenidos de PC no mayores del 7.0 % (Andrade-Montemayor *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante tener en cuenta que en estudios previos se ha indicado que la PC de la vaina de mezquite no es fácilmente disponible para degradación en el rumen, si se ofrece como vaina en bruto (Aguilar-Borjas, 2009; Andrade-Montemayor *et al.*, 2009). Además, los carbohidratos se encuentran en el mesocarpio, lo cual también dificulta su extracción y fermentación (Román, 2016).

Por tales motivos, se ha recomendado el procesamiento de la vaina previo a la alimentación del animal, por ejemplo, a través del tostado y/o triturado del material (Andrade-Montemayor *et al.*, 2011; Román, 2016). Adicionalmente, el tostado de las vainas tendría el potencial de inactivar algunos componentes anti-nutricionales que puedan impedir la degradación de las proteínas y carbohidratos contenidos en las semillas de mezquite.



**Figura 1.** Volumen fraccional de gas producido por la fermentación *in vitro* de muestras de mezquite (*Prosopis spp.*) obtenidas de cuatro municipios de la ecorregión árida del estado de Hidalgo, México. San Salvador (SAL), Tula (TUL), Actopan (ACT) y Zimapán (ZIM)

Los valores de FC de las vainas colectadas son superiores a los reportados en estudios previos (Sawal *et al.*, 2004; García-López *et al.*, 2019). Ruiz-Nieto *et al.* (2020) señalan un amplio rango en el contenido de FC para la vaina de mezquite (11-33%) lo cual se asocia al estado fenológico de la planta al momento de la cosecha de vainas (Cerón-Ortiz *et al.*, 2015). En el mismo sentido, el contenido de FDN fue mayor a los encontrados en estudios previos que reportaron valores entre 24.5 y 35.3 % (Andrade-Montemayor *et al.*, 2011; Peña-Avelino *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017), lo cual se asocia con el estado de madurez al momento de colección y procesamiento. Como se mencionó anteriormente, en el presente estudio las vainas de mezquite fueron procesadas y analizadas secas, lo cual permitió que se llevaran a cabo transformaciones bioquímicas dentro del proceso de madurez de los frutos, incrementando el contenido de azúcares estructurales y no estructurales (Cerón-Ortiz *et al.*, 2015). Es importante mencionar que la mayoría de la fibra contenida en las vainas se encuentra en las valvas de esta, mientras que la proteína y los carbohidratos degradables se encuentran en la semilla. Por lo tanto,

encontrar la especie de mezquite o el estado fisiológico que maximice la relación semilla-valva es un objetivo para investigaciones futuras.

Las diferencias del contenido y perfil de carbohidratos de las vainas de mezquite entre sitios de colecta pueden ser dilucidadas a través de los patrones de fermentación *in vitro*. El potencial de fermentación dado por el valor de V fue mayor en vainas colectadas en el municipio de SAL, lo cual podría ser explicado parcialmente por su contenido menor de FDN. Además, las vainas colectadas en SAL y ACT muestran patrones similares de producción de gas de la fracción fácilmente fermentable (< 20 horas de fermentación). Las similitudes observadas en los patrones de fermentación *in vitro* entre vainas colectas en SAL y ACT podrían estar asociadas a condiciones agroecológicas similares y cercanía geográfica. De la misma manera, las diferencias entre municipios en los patrones de fermentación (Vf) se asocian al hecho de que las condiciones hídricas y edafológicas tienen una repercusión directa en el contenido de biomoléculas

producidas a través de la fotosíntesis de manera natural por las plantas (Cerón-Ortiz *et al.*, 2015).

Las diferencias entre municipios en cuanto al volumen parcial de CH<sub>4</sub> fueron significativas únicamente para la medición realizada a las 24 horas de incubación, lo cual se explica en parte por el contenido elevado de carbohidratos solubles de la vaina de mezquite que pueden ser degradados rápidamente y fermentados durante las primeras horas de incubación. La producción de CH<sub>4</sub> a las 24 horas coincide con lo indicado por Soltan *et al.* (2012), quienes reportaron emisiones de 11.7 mL por g de materia orgánica degradada en un ensayo *in vitro*. Aunque las vainas de mezquite contienen un bajo contenido de almidón, son ricas en carbohidratos no estructurales como sacarosa, fructuosa, manosa y galactosa, lo cual promueve cambios a nivel ruminal, consumo de materia seca y palatabilidad (Almeida *et al.*, 2017; Aguiar *et al.*, 2015).

Los resultados del presente estudio, no permiten establecer claramente las causas asociadas con las diferencias en la producción de CH<sub>4</sub> entre zonas de muestreo. Sin embargo, estas podrían asociarse con diferencias en la composición química, principalmente de carbohidratos, en las vainas de mezquite entre municipios, aunque debido a las limitantes del presente estudio estos resultados no son concluyentes. En este mismo sentido, Hindrichsen *et al.* (2005) señalan que el mayor contenido de carbohidratos representa una fuente importante de sustrato para la producción de CH<sub>4</sub>, lo cual coincide con los resultados del presente trabajo al ser las vainas con mayor producción de CH<sub>4</sub> las que manifestaron mayor contenido de ELN (almidones y azúcares). Otro factor que puede influir en la producción de CH<sub>4</sub> es la concentración de componentes secundarios, los cuales muestran variación de acuerdo con las condiciones agroclimáticas. Dos Santos *et al.* (2013) refiere que las vainas de mezquite son ricas en juliprosina, prosoflorina y juliprosopina, compuestos que han

demostrado tener efectos positivos sobre la producción de CH<sub>4</sub> en rumiantes. Por lo tanto, futuros estudios deben ser enfocados en el papel de componentes secundarios presentes en la vaina de mezquite sobre los niveles de producción de CH<sub>4</sub> entérico (Obeidat *et al.*, 2008; Obeidat y Shdafat, 2013) y su interacción con las condiciones agroecológicas.

Los resultados del presente estudio confirman los hallazgos de estudios previos los cuales refieren que la vaina de mezquite posee una composición química adecuada para ser utilizada como fuente de alimentación animal con el contenido elevado de carbohidratos estructurales y nivel medio de proteína como principales atributos (García-López *et al.*, 2019; Ruiz-Nieto *et al.*, 2020). Un estudio realizado en bovinos de engorda reveló patrones de crecimiento similares entre dietas que utilizaron como fuente de energía vainas de mezquite y maíz, sin modificaciones en la calidad y composición química de la canal (Almeida *et al.*, 2017). Además, la vaina de mezquite representa una opción frente a la utilización de ingredientes convencionales con características nutricionales similares, pero a mayor costo, y principalmente con disponibilidad en la época seca. El remplazo de la vaina de mezquite por ingredientes como grano de maíz, avena o salvado de trigo ha reducido los costos de alimentación en rumiantes entre un 20 a 26 % sin efectos en el rendimiento y calidad de los productos (Sawal *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio proporcionan evidencia de las diferencias en los patrones de fermentación *in vitro* y emisiones de CH<sub>4</sub> de la vaina de mezquite en función del municipio de colecta, lo cual debe ser considerado en el diseño e implementación de futuras estrategias nutricionales y de mitigación de gases de efecto invernadero.

**Tabla 3.** Volumen parcial (mL/g MS) de metano *in vitro* de vainas de mezquite (*Prosopis spp.*) a diferentes tiempos de incubación de cuatro municipios de la ecorregión árida del estado de Hidalgo, México.

Municipio	Tiempo de incubación (h)				EEM	Nivel de significancia		
	24	32	48	72		Municipio (M)	Tiempo (T)	M×T
Actopan	17.3 <sup>a</sup>	5.5	5.2	5.6	1.2			
San Salvador	16.3 <sup>a</sup>	9.4	5.3	6.3	1.2	0.006	0.001	0.005
Tula	10.5 <sup>b</sup>	8.0	4.5	6.3	1.2			
Zimapán	11.9 <sup>b</sup>	6.6	4.9	7.0	1.2			

<sup>abc</sup> Diferentes superíndices en la misma columna muestran diferencias significativas entre sitios ( $p \leq 0.05$ ).

EEM: error estándar de la media.

**Funding.** This research was funded by Secretaría de Educación Pública, project PRODEP UAEH-PTC-823 granted to Dr. Juan Carlos Ángeles Hernández.

**Conflict of interests.** Nothing to declare.

**Compliance with ethical standards.** This research was conducted under supervision and approval of Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo ethical committee regarding the use of experimental animals.

**Data availability.** Data would be available upon reasonable request to the corresponding author Dr. Oscar Enrique del Razo Rodríguez ([oscare@uaeh.edu.mx](mailto:oscare@uaeh.edu.mx)).

## REFERENCIAS

- AOAC., 2005. Official methods of analysis of AOAC International. 18<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- Aguiar, L.V., Pedreira, M.D.S., Silva, H.G.D.O., Caires, D.N., Silva, A.S. and Silva, L.C.D., 2015. Fine mesquite pod meal on performance, palatability and feed preference in lambs. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 37, pp. 411-417. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v37i4.27804>
- Aguilar-Borjas, J.H., 2009. Efecto del tostado de la vaina de mesquite (*Prosopis laevigata*) en la composición, degradabilidad In situ y cinética de degradación de la materia seca, proteína cruda, fibra detergente neutro y fibra detergente ácida en caprinos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Almeida, M.D.P., Souza, E.J.O.D., Vêras, A.S.C., Morais, Í.M.D.V., Vítor, D.R. and Silva, J.R.C.D., 2017. Cuts of dairy-origin cattle fed mesquite pod meal in replacement of corn. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 39: pp. 401-407. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v39i4.35176>
- Andrade-Montemayor, H.M., Cordova-Torres, A.V., García-Gasca, T. and Kawas, J.R., 2011. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). *Small Ruminant Research*, 98(1-3), pp. 83-92. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.023>
- Andrade-Montemayor, H.M., Alegría-Ríos, F. S., Pacheco-López, M., Aguilar-Borjas, J. H., Villegas-Díaz, J. L. O. and Basurto-Gutierrez, R., 2009. Effect of dry roasting on composition, digestibility and degradability of fiber fractions of mesquite pods (*Prosopis laevigata*) as feed supplement in goats. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 11(1), pp. 237-243. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/108>
- Armijo-Nájera, M., Moreno-Reséndez, A., Blanco-Contreras, E., Borroel-García, V. and Reyes-Carrillo, J., 2019. Vaina de mezquite (*Prosopis* spp.) alimento para el ganado caprino en el semidesierto. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(1), pp. 113-114. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i1.1728>
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J. and Wang, M., 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal*, 14(S1): pp. s2-s16. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003100>
- Cerón-Ortiz, A.N., Vidal-Gómez, A.Y. and Ángeles-Monroy, M.A., 2015. Impacto del estado de madurez de la vaina de mezquite (*Prosopis laevigata*) en su composición fisicoquímica posterior a su transformación en polvo. *Revista Congreso Nacional de Ingeniería y Tecnologías para el Desarrollo Sustentable*. 1, pp. 1-7. [http://conainte.itsoeh.edu.mx/revista/docs/VOL1\\_01-07.pdf](http://conainte.itsoeh.edu.mx/revista/docs/VOL1_01-07.pdf)
- DOF (Diario Oficial de la Federación)., 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Recuperado el 28 de Septiembre de 2020, de: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=762506&fecha=22/08/2001)
- Dos Santos, E.T., Pereira, M.L.A., Da Silva, C.F.P.G., Souza-Neta, L.C., Geris, R., Martins, D., Santana, A.E.G., Barbosa, L.C.A., Silva, H.G.O., Freitas, G.C., Figueiredo, M.P., De Oliveira, F.F. and Batista, R., 2013. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on *in Vitro* ruminal digestion. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), pp. 8496-8516. <https://doi.org/10.3390/ijms14048496>
- Fernández-Badillo, L., Manríquez-Morán, N.L., Castillo-Cerón, J.M. and Goyenechea, I., 2016. Herpetofaunistic analysis of the arid



- zone of the Hidalgo State. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87(1), pp. 156-170. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.01.009>
- Férrer, J.P., da Cunha, M.V., dos Santos, M.V.F., Torres, T.R., da Silva, J.R.C., Véras, R.M.L., da Silva, D.C., da Silva, A.H., Queiroz, L.M.D., Férrer, M.T., Neto, E.L.S., Jaramillo, D.M. and de Souza, E.J.O., 2021. Mesquite (*Prosopis juliflora*) extract as a phyto-genic additive for sheep finished on pasture in the semiarid region. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 81(1), pp. 14-26. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392021000100014>
- García-López, J.C., Vicente-Martínez, J.G., Rendón-Huerta, J.A., Ruiz-Tavares, D., López-Aguirre, S., Lee-Rangel, H.A., Pinos-Rodríguez, J.M., Álvarez-Fuentes, G., de Nova, J.A., Durán-García, H.M. and Salinas-Rodríguez, M., 2019. Producción y contenido nutrimental de vainas de tres variantes de mezquite (*Prosopis laevigata*) en el altiplano potosino, México. *Agrociencia*, 53(6), pp. 821-831. <https://www.agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/1846>
- Geesing, D., Felker, P. and Bingham, R. L., 2000. Influence of mesquite (*Prosopis glandulosa*) on soil nitrogen and carbon development: Implications for global carbon sequestration. *Journal of Arid Environments*, 46(2), pp. 157-180. <https://doi.org/10.1006/jare.2000.0661>
- Hindrichsen, I. K., Wettstein, H. R., Machmüller, A., Jörg, B., and Kreuzer, M. (2005). Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environmental Monitoring and Assessment*, 107(1), pp. 329-350. <https://doi.org/10.1007/s10661-005-3008-3>
- INEGI., 2017. Anuario Estadístico y Geográfico de Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México. <https://www.inegi.org.mx/app/biblioteca/ficha.html?upc=702825095093>
- IPCC., 2014. Climate Change 2014: Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Edenhofer, O., R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Lofgreen, G.P., 1953. The estimation of total digestible nutrients from digestible organic matter. *Journal of Animal Science*, 12, pp. 359-365. <https://doi.org/10.2527/jas1953.122359x>
- Mahgoub, O., Kadim, I.T., Forsberg, N.E., Al-Ajmi, D.S., Al-Saqry, N.M., Al-Abri, A.S. and Annamalai, K., 2005. Evaluation of Mesquit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*, 121(3-4), pp. 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.01.016>
- Obeidat, B.S., Abdullah, A.Y. and Al-Lataifeh, F.A., 2008. The effect of partial replacement of barley grains by *Prosopis juliflora* pods on growth performance, nutrient intake, digestibility, and carcass characteristics of Awassi lambs fed finishing diets. *Animal Feed Science and Technology*, 146(1-2), pp. 42-54. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.12.002>
- Obeidat, B.S. and Shdaifat, M.M., 2013. Partial substitution of barley grain with *Prosopis juliflora* pods in lactating Awassi ewes' diets: Effect on intake, digestibility, and nursing performance. *Small Ruminant Research*, 111(1-3), pp. 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.09.013>
- Palacios Romero, A., Jiménez Muñoz, E., Rodríguez Laguna, R. and Razo Zárate, R., 2021. Distribución potencial de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd.) MC Johnst. en el estado de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 12(63), pp. 71-87. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i63.812>
- Patnaik, P., Abbasi, T. and Abbasi, S.A., 2017. Prosopis (*Prosopis juliflora*): blessing and bane. *Tropical Ecology*, 58(3), pp. 455-483.
- Pelcastre, A.A.S., Mella, M.R., Ávila, N.L.R. and Martínez, B.C., 2020. Tropical trees and shrubs with potential to reduce the production of methane in ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2), pp. 1-16. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/3061>
- Peña-Avelino, L.Y., Pinos-Rodríguez, J.M., Yáñez-Estrada, L., Juárez-Flores, B.I., Mejía, R. and Andrade-Zaldivar, H., 2014. Chemical composition and *in vitro* degradation of red and white mesquite (*Prosopis laevigata*)

- pods. *South African Journal of Animal Science*, 44(3), pp. 298-306. <https://doi.org/10.4314/sajas.v44i3.12>
- Ramirez-Bribiesca, J.E., Wang, Y., Jin, L., Canam, T., Town, J.R., Tsang, A., Dumonceaux, T.J. and McAllister, T. A., 2011. Chemical characterization and *in vitro* fermentation of Brassica straw treated with the aerobic fungus, *Trametes versicolor*. *Canadian Journal of Animal Science*, 91, pp. 695–702. <https://doi.org/10.4141/cjas2011-067>
- Román, H., 2016. Bromatología de la vaina de mezquite (*Prosopis* spp.) como alternativa para consumo sustentable en la comarca lagunera. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Recuperado el 28 de Septiembre de 2020, de: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7981/HORACIO%20ROMAN%20PEREZ.pdf?sequence=1>
- Ruiz-Nieto J.E., Hernández-Ruiz J., Hernández Marín J., Mendoza-Carrillo J. Abraham-Juárez M., Isordia-Lachica, P.M. and Mireles-Arriaga, A.L., 2020. Mesquite (*Prosopis* spp.) tree as a feed resource for animal growth. *Agroforest Systems*, 94, pp. 1139–1149. <https://doi.org/10.1007/s10457-020-00481-x>
- Saco, P.M., Willgoose, G.R. and Hancock, G.R., 2007. Eco-geomorphology of banded vegetation patterns in arid and semi-arid regions. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11(6), pp. 1717-1730. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1717-2007>
- SAS Institute Inc., 2012. SAS/STAT® 12.1 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Sawal, R.K., Ratan, R. and Yadav, S.B.S., 2004. Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource for livestock - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 17(5), pp. 719-725. <https://doi.org/10.5713/ajas.2004.719>
- Schofield, P. and Pell, A.N., 1995. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: a comparison involving three forages. *Journal of Dairy Science*, 78(10), pp. 2230-2238. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76850-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76850-3)
- Sejian, V., Bhatta, R., Soren, N.M., Malik, P.K., Ravindra, J.P., Prasad, C.S. and Lal, R., 2015. Introduction to concepts of climate change impact on livestock and its adaptation and mitigation. In: Sejian V., Gaughan J., Baumgard L., Prasad C. (eds) *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*. Springer, New Delhi, (pp. 1-23). DOI: [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1_1)
- Soltan, Y.A., Morsy, A.S., Sallam, S.M.A., Louvandini, H. and Abdalla, A.L., 2012. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 21(4), pp. 759-772. <https://doi.org/10.22358/jafs/66148/2012>
- Stewart, B.A., 2016. Dryland Farming. Reference Module in Food Science. West Texas A&M University, Canyon, TX, USA.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and 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), pp. 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Torres-Salado, N., Sánchez-Santillán, P., Herrera-Pérez, J. and Hernández-Morales, J., 2018. Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. *Archivos de Zootecnia*, 67(257), pp. 55-59. <https://www.uco.es/ucopress/az/index.php/az/article/view/3491/2122>
- Van Soest, P.J. and Wine, R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal of AOAC International*, 51(4), pp. 780-785. <https://doi.org/10.1093/jaoac/51.4.780>
- Yoo, M., Han, S.J. and Wee, J. H., 2013. Carbon dioxide capture capacity of sodium hydroxide aqueous solution. *Journal of Environmental Management*, 114, pp. 512-519. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.10.061>