

Reducción de la metanogénesis ruminal *in vitro* con aceites vegetales de *Thevetia peruviana* y *Persea americana*

In vitro ruminal methanogenesis reduction with vegetable oils *Thevetia peruviana* and *Persea americana*

Karlos Edmundo Orozco-Durán¹, José Herrera-Camacho^{1*}, Octavio Alonso Castelán-Ortega², Liliana Márquez-Benavides¹, Otoniel Buenrostro-Delgado¹, Juan Carlos Kú-Vera³

¹ Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5. El Trébol, CP 58893. Tarímbaro, Michoacán, México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

³ Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán.

*Autor de correspondencia: josheca@hotmail.com

Artículo científico recibido: 27 de enero de 2014, **aceptado:** 4 de agosto de 2014

RESUMEN. Se evaluó el efecto de la adición de proporciones 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 % de aceites de semillas de *Thevetia peruviana* (TP) y frutos de aguacate *Persea americana* (AG) en cultivos *in vitro* de fluido ruminal bovino sobre la producción de gas (PG), metano (CH₄), la digestibilidad de materia seca (DIVMS) y fibra detergente neutra (DIVFDN). Se utilizó un modelo lineal de contrastes ortogonales para el análisis de datos. Se encontró efecto (p < 0.0001) en la inclusión de ambos aceites sobre la PG a partir del 4 %, con una producción promedio de 220 cm³. En la producción de CH₄, se encontró una disminución a partir del 3 % de inclusión de ambos aceites (p < 0.0001), con efecto lineal y cuadrático al aumentar la dosis. La DIVMS del tratamiento testigo fue del 67.2 %, disminuyendo significativamente a partir de los niveles 4, 5 y 6 % de ambos aceites. La DIVFDN, mostró una tendencia similar, disminuyendo en ambos tratamientos de manera significativa a partir del 4 % de inclusión. Para todas las variables evaluadas se encontró un efecto del nivel de aceite, pero no se observó efecto del tipo de aceite. El nivel del 3 % de suplementación de aceites de TP y AG redujo la producción de CH₄, sin afectar la producción de gas y digestibilidad del forraje, por lo que puede ser el nivel más apropiado para evaluar su potencial en condiciones *in vivo*.

Palabras clave: Ácidos grasos, aguacate, adelfa amarilla, rumiantes, cambio climático

ABSTRACT. The effect of adding different proportions 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 % of *Thevetia peruviana* (TP) and avocado fruit *Persea americana* (AG) seed oils, was evaluated over gas production (GP), methane (CH₄) dry matter digestibility (IVDMD) and neutral detergent fiber digestibility (IVDNDF) in a cultured bovine rumen fluid system. For data analysis a lineal model of orthogonal contrasts was used. Finding an effect of both oils (P < 0.001) over GP from 4 % inclusion, with an average production of 220 cm³. In the methane production, a decrease from 3 % inclusion was found in both treatments (P < 0.0001), with a linear and quadratic effect when the oils doses were increased. The IVDMD of control treatment was 67.2 %, significantly decreasing from levels 4, 5 and 6 % in both treatments, IVDNDF showed a similar trend, declining significantly in both treatments from 4 % inclusion in both oils. For all the evaluated variables an effect of the inclusion level was found, but not an effect related to the type of oil. The 3 % of TP and AG oil supplementation reduces CH₄ production without affecting gas production, either forage digestibility, so this level could be the more appropriate to evaluate its potential *in vivo* conditions.

Key words: Fatty acids, avocado, yellow oleander, ruminants, climate change

INTRODUCCIÓN

La fermentación entérica de los carbohidratos estructurales de pastos y forrajes, celulosa, hemicelulosa y lignina, es la principal fuente CO₂ y metano (CH₄), emitidos por el sector agropecuario mundial (Eckard *et al.* 2010, Dewhurst 2013). La actividad ganadera genera cerca del 90 % del metano emitido al medio ambiente (Cottle *et al.* 2011, Gerber *et al.* 2013). En producción animal, la generación de metano representa energía liberada, que no se aprovecha para el mantenimiento y producción de los rumiantes y por tanto, hace que sea menos eficiente el uso de los recursos forrajeros. La pérdida fluctúa entre 3 y 13 % de la energía bruta contenida en la ración (Miller y Wollin 2001).

Dentro de las estrategias alimenticias para mitigar la metanogénesis entérica, la suplementación con fuentes de ácidos grasos poliinsaturados de origen animal o vegetal se postula como una medida efectiva (Hristov *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2014). Los ácidos grasos poliinsaturados mitigan la producción de metano mediante la defaunación que ejercen sobre bacterias gram⁺ y protozoarios, además de la captación de iones de H⁺ libre, saturando los enlaces dobles en sus cadenas en un proceso de biohidrogenación, lo que disminuye la disponibilidad de H⁺ para la síntesis de CH₄, (Martin *et al.* 2010). Sin embargo, la suplementación alimenticia con grasas, aceites y fuentes de ácidos grasos se ha asociado con la reducción de la cinética de fermentación y la degradabilidad de los sustratos (Hook *et al.* 2010, Hristov *et al.* 2012), disminuyendo la tasa de fermentación ruminal y modificando los patrones de síntesis de ácidos grasos volátiles en el rumen, ya que aumenta la síntesis de butirato y disminuye la proporción molar de acetato (Kong *et al.* 2010). Algunos aceites vegetales tienen en su composición química ciertos metabolitos secundarios (terpenoides, isoprenoides, compuestos aromáticos entre otros) que contribuyen a la reducción de las emisiones de metano, mediante la defaunación selectiva de las poblaciones de protozoarios y metanógenos asociados (Mao *et al.* 2010, Benchaar y Greathead 2011). El uso de aceites

vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados en la nutrición animal, ha sido cuestionado, ya que compiten con la nutrición humana; sin embargo, si son accesibles en costo, abundancia relativa y adicionalmente poseen metabolitos secundarios, representan una alternativa para la mitigación de CH₄ en la producción ganadera (Beauchemin *et al.* 2008, Sallam *et al.* 2009).

A nivel mundial, más de la mitad de los rumiantes domésticos habitan en regiones tropicales, en las que consumen forrajes de baja digestibilidad y con disponibilidad sujeta a las condiciones climáticas y estacionales, no obstante, persiste una firme presión por una mayor cantidad y calidad de productos de origen animal (FAO 2009). En dicho contexto, el uso de complementos alimenticios como los aceites vegetales provenientes de especies nativas en las regiones ganaderas, son un recurso renovable y sustentable (Abdalla *et al.* 2012). Los aceites de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y de aguacate (*Persea americana*) poseen un rendimiento y perfil de ácidos grasos similares a fuentes lipídicas como soya, coco, canola y girasol (Odihambo *et al.* 2012). Adicionalmente, en el aceite de adelfa amarilla se han descrito propiedades insecticidas, antibióticas y antifúngicas (Kareru *et al.* 2010). Por otro lado, en el aceite de aguacate se han encontrado compuestos bioactivos como fenoles, alcanos, cetonas, fitoesteroles y carotenos (Dos Santos *et al.* 2014). Aunque no se ha documentado su comportamiento, ni su toxicidad en sistemas de fermentación ruminal *in vitro*, ambos aceites son candidatos en nutrición animal como mitigadores de metano teniendo en cuenta su composición química (Ibiyemi *et al.* 2002, Ortiz *et al.* 2003). El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de diferentes proporciones de aceites de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y aguacate Hass (*Persea americana*) sobre la metanogénesis y la digestibilidad *in vitro* de pasto estrella de África.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y

Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en Tarímbaro, Michoacán, México, ubicada en los 19° 45' 00" LN y los 19° 54' 00" de LO, a una altitud media sobre el nivel del mar de 1883 m. El clima predominante es templado subhúmedo con lluvias en verano (Cw1) (García 1964).

Extracción de aceites y perfil de ácidos grasos

Para la obtención de aceite de adelfa amarilla (*T. peruviana Schum*) (TP) se cosecharon frutos maduros en el municipio de Tuzantla, Michoacán. Las semillas limpias se sometieron a un proceso de prensado mecánico a temperatura ambiente, separando el aceite crudo que se filtró y almacenó en frascos de color ámbar a temperatura ambiente, adicionando 0.1 ml de vitamina E como agente conservador.

El aceite de aguacate Hass (*P. americana Miller var Hass*) (AG) se obtuvo de frutos no aptos para la comercialización en huertos y empacadoras del municipio de Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Los frutos se deshidrataron a 65 °C durante 48 h y se trituraron para obtener una pasta, de la cual se extrajo la fracción oleosa de acuerdo al método número 30 descrito por la AOAC (2000), utilizando como solvente orgánico hexano grado reactivo.

En ambos aceites se analizó el perfil de ácidos grasos, a partir de una muestra de 50 mg que se mezcló con 6 ml de solución Folch durante 24 h. Posteriormente, las muestras se sometieron a sonicación por 15 min, a 4 °C, para su posterior evaporación a 30 °C. Se les realizó un proceso de derivación lipídica de acuerdo al método de Folch *et al.* (1957) con 2.5 ml de una solución metanol: ácido clorhídrico (95:5), a 85 °C por 2.5 h. Luego, las muestras se diluyeron al 5 % con hexano, adicionándose 10 μ l de butil hidroxil tolueno como antioxidante y 10 μ l de ácido tricosenoico como estándar interno. Las muestras se colocaron en viales para cromatografía de color ámbar, para luego realizar su inyección de 1 μ l en un cromatógrafo de gases marca Agilent 6850. Utilizándose una columna (Aient BD-23) de 50 % Cyanopropyl, 50 % methylpolysiloxano, con longitud de 30 m X

0.25 mm de espesor con un diámetro interno de 0.25 μ m. Como gas de acarreo se usó Helio grado cromatográfico, con flujo de H⁺ a 40 ml min⁻¹. Al final se realizó la identificación y cálculo de la concentración relativa de los ácidos grasos comparando el tiempo de retención de las muestras y el área de los cromatogramas contra los estándares de referencia 37 componente FAME mix, supelco y marinol.

Forraje sustrato

Se utilizó heno de pasto estrella africana (*Cynodon plechtostachuys*) que contenía 12.1 % de proteína cruda, 1.7 % de extracto etéreo, 71.29 % de fibra detergente neutra (FDN), 28.29 % de fibra detergente ácida (FDA) y 35.49 % de extracto libre de nitrógeno (AOAC, 2006). El pasto se deshidrató en un horno de aire forzado a 56 °C por 24 h, para luego pulverizarlo a 300 rpm por 2 min y tamizarlo con una malla de 1 mm. El contenido de materia seca de la muestra fue de 94 %.

Cultivo *in vitro*

Los tratamientos se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* durante 96 h, de acuerdo a la técnica de Theodorou *et al.* (1994). El cultivo se efectuó en botellas de vidrio de 125 ml, herméticamente selladas con tapón de goma. Los frascos contuvieron al forraje sustrato (0.99 g), 90 ml de una solución de saliva artificial y 10 ml de líquido ruminal como agente inoculante. Para la extracción de líquido ruminal se seleccionaron dos vacas Holstein secas e intactas, con un peso promedio de 540 \pm 30 Kg. Los animales se alimentaron con una dieta de 80 % forraje (ensilado y rastrojo de maíz) y 20 % de alimento concentrado comercial. El método de colecta del líquido ruminal fue por sondeo orogástrico, insertando una sonda de polietileno con punta roma por vía oral, los animales se sedaron antes de cada colecta con 0.25 mg por kg de peso con clorhidrato de xilazina. La sonda se acopló a una bomba manual de vacío, depositando el líquido ruminal en un contenedor térmico herméticamente sellado a temperatura de 38.5 °C. Durante la extracción del fluido ruminal,

la primera porción obtenida se descartó, por su alto contenido de saliva. El cultivo se realizó a 39 °C, la medición de la producción de gas se llevó a cabo con un manómetro digital portátil (Lutron PS) cada 60 min, durante las primeras 8 h de cultivo, para posteriormente operarse a intervalos de 4 h, hasta la conclusión a las 96 h.

Tratamientos

Nueve frascos por tratamiento se sometieron a cultivo, en aceite de *Persea americana*, aceite de *Thevetia peruviana* y un grupo control (0 g). Cada tratamiento se manejó con las siguientes proporciones: 0 % (0 g aceite y 1 g de sustrato), 1 % (0.01 g aceite y 0.99 g sustrato), 2 % (0.02 g aceite y 0.98 g sustrato), 3 % (0.03 g aceite y 0.97 g sustrato), 4 % (0.04 g aceite y 0.96 g sustrato), 5 % (0.05 g aceite y 0.95 g sustrato) y 6 % (0.06 g aceite y 0.94 g sustrato), el pasto sustrato se administró en base a su materia seca previamente calculada (94 %).

Medición de metano

Para la cuantificación de la producción de CH₄ en las muestras incubadas, se tomaron 2 ml de biogás en los frascos de cultivo, que se almacenó en tubos plásticos de 15 ml de capacidad, herméticamente sellados y libres de aire, que contenían 13 ml de una solución salmuera ácida (pH = 4), preparada con cloruro de sodio granulado a saturación, en 1 000 ml de agua destilada, ajustando el pH con ácido clorhídrico. Las muestras de biogás se inyectaron a un volumen de 0.5 cm³, con una jeringa de vidrio y aguja calibre 22s marca Hamilton, en un cromatógrafo de gases Varian Chrompack CP 3800, utilizando H⁺, aire comprimido y N₂ como gases de acarreo en una columna de acero inoxidable, revestida de sílica gel, con 7.5 m de longitud y un diámetro interno de 0.25 mm. Como estándar de referencia se utilizó metano al 99.99 % de pureza. Se calculó el promedio de CH₄ por cm³ de biogás inyectado para poder estimar la producción total acumulada de metano por g de materia seca del forraje sustrato, en función de la producción total de biogás acumulado por tratamiento.

Análisis de digestibilidad

Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se procedió a filtrar el residuo sólido de los frascos al final de la fermentación *in vitro*, utilizando filtros grado 54 (Whatman). Una vez recuperados los residuos se llevaron a deshidratación. Para evaluar la digestibilidad de la fibra detergente neutra (DIVFDN), se tomaron 50 ml de solución FDN en los residuos de la producción de gas, que se colocaron en un autoclave a 105 °C por una hora, para luego filtrar en crisoles Goosh del número uno, posteriormente se deshidrataron a 65 °C por 12 h. El cálculo de DIVMS se realizó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la materia seca (MS) final del residuo de producción de gas, mientras que la DIVFDN se calculó teniendo en cuenta el contenido de la FDN de la muestra entre el contenido de FDN de la muestra intacta (Van Soest et al. 1991).

Variables evaluadas

Las variables analizadas fueron: producción acumulada de gas (PG), producción de CH₄ en cm³ g⁻¹ de MS de sustrato, digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS %) y digestibilidad *in vitro* de la fibra neutro detergente (DIVFDN %).

Análisis de datos

Los datos se analizaron bajo el procedimiento GLM, aplicándose contrastes ortogonales entre los niveles (dosis) de cada tratamiento (aceite), y de la interacción tratamiento x nivel, la diferencia entre los tratamientos se determinó mediante mínimos cuadrados. En todos los análisis se utilizó el paquete estadístico SAS 9.0 para Windows.

RESULTADOS

El perfil de ácidos grasos de los aceites de TP y AG (Tabla 1), muestra que la concentración de ácidos grasos insaturados fue alta con valores del 70 y 80 %, respectivamente; predominando el ácido oleico, que representó casi 50 % de los ácidos grasos.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos y su concentración en aceite de semillas de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y frutos de aguacate (*Persea americana*).

Tipo de ácido graso	Aceite de adelfa amarilla (<i>Thevetia Peruviana</i> Schum)	Aceite de aguacate Hass (<i>Persea americana</i> Miller)
Palmítico (C16:0)	19.4 %	19.3 %
Palmitoleico (C16:1 n-7)	0.4 %	8.4 %
Esteárico (C18:0)	7.9 %	-
Oleico (C18:1 n-9)	49.3 %	47.9 %
Vaccénico (C18:1 n-7)	0.7 0 %	7.0 %
Alfa-linoleico (C18: 2 n-6)	20.6 %	15.9 %
Alfa-linolénico (C18:3 n-3)	-	1.5 %
Araquídico (C 20 :0)	1.7 %	-

Tabla 2. Medias de cuadrados mínimos de los efectos de la inclusión de aceites de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y frutos de aguacate (*Persea americana*) sobre la producción acumulada de gas (PG) y metano (CH₄) en condiciones *in vitro*.

% de inclusión de aceite	Aceite de adelfa amarilla (<i>Thevetia Peruviana</i> Schum)		Aceite de aguacate Hass (<i>Persea americana</i> Miller)	
	PG (cm ³)	CH ₄ (cm ³)	PG (cm ³)	CH ₄ (cm ³)
0 %	232.0	91.7	232.0	91.7
1 %	233.2	91.3	231.0	90.4
2 %	230.0	87.0	227.5	88.1
3 %	226.9	81.4 ^a	226.5	83.7 ^a
4 %	223.1 ^a	73.0 ^a	223.4 ^a	78.0 ^a
5 %	221.1 ^a	63.9 ^a	224.24 ^a	68.3 ^a
6 %	216.9 ^a	58.1	215.3 ^a	60.2 ^a
CME	13.7	6.7	11.3 ^a	10.8 ^a
Significancia				
Lineal	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cuadrática	0.2050	<0.0001	0.0066	<0.0001
Dosis	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Aceite	0.1533	0.0256	0.2136	0.0136
Dosis x Aceite	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

^a Indica diferencia significativa en las columnas (p < 0.0001), CME= Cuadrado medio del error, Significancia= p < 0.0001 indica diferencia significativa.

Producción de gas

La producción promedio fue de 224 cm³ g⁻¹ de MS del sustrato en TP y de 223 cm³ g⁻¹ en AG, observándose una disminución significativa en los tratamientos de 4, 5 y 6 % de ambos tipos de aceites. Se observó un efecto lineal del nivel de inclusión de aceite sobre la producción de gas *in vitro*, así como una interacción del tratamiento x nivel (p < 0.0001) (Tabla 2).

Producción de metano

La adición de aceite de TP y AG, afectó la producción de CH₄ entre 19 y 30 cm³ a partir del tratamiento de 3 % de aceite, respecto al tratamiento control, observándose la menor producción de metano en los niveles del 5 y 6 % de ambos aceites. Se observó un efecto lineal y cuadrático de

la dosis de aceite y de la interacción tratamiento x nivel (p < 0.0001), sin encontrar un efecto del tipo de aceite (Tabla 2).

Digestibilidad del forraje

La DIVMS, mostró una disminución (p < 0.001), con la adición de aceite de TP y AG en los tratamientos con más de 3 %, lo que tuvo impacto en la DIVFDN que mostraron un comportamiento similar. El tratamiento control presentó una DIVMS promedio del 67.2 %, que se redujo hasta 11 % en el tratamiento con 6 % de aceite. El contenido de FDN del sustrato fue del 71.2 %. Sin embargo, durante el proceso de producción de gas *in vitro*, el tratamiento control presentó una DIVFDN promedio de 52.52 %, la cual se redujo hasta 37 % en los tratamientos con los mayores contenidos de aceites.

Tabla 3. Medias de cuadrados mínimos para la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y de la fibra detergente neutra (DIVFDN) en pasto estrella de África (*Cynodon plechstostachyus*) incubado con distintos niveles de aceites de *Thevetia peruviana* y *Persea americana*.

% de inclusión de aceite	Aceite de adelfa amarilla (<i>Thevetia Peruviana</i> Schum)		Aceite de aguacate Hass (<i>Persea americana</i> Miller)	
	DIVMS (%)	DIFDN (%)	DIVMS (%)	DIFDN (%)
0 %	232.0	91.7	232.0	91.7
1 %	233.2	91.3	231.0	90.4
2 %	230.0	87.0	227.5	88.1
3 %	226.9	81.4 ^a	226.5	83.7 ^a
4 %	223.1 ^a	73.0 ^a	223.4 ^a	78.0 ^a
5 %	221.1 ^a	63.9 ^a	224.24 ^a	68.3 ^a
6 %	216.9 ^a	58.1	215.3 ^a	60.2 ^a
CME	13.7	6.7	11.3 ^a	10.8 ^a
Significancia				
Lineal	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cuadrática	0.2050	<0.0001	0.0066	<0.0001
Dosis	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Aceite	0.1533	0.0256	0.2136	0.0136
Dosis x Aceite	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

^a Indica diferencia significativa en las columnas ($p < 0.0001$), CME= Cuadrado medio del error, Significancia= $p < 0.0001$ indica diferencia significativa.

Tanto en la DIVMS como en DIVFDN se observó un efecto lineal y cuadrático con la dosis de aceite y de la interacción dosis x aceite ($p < 0.0001$), sin encontrarse efecto del tipo de aceite (Tabla 3).

DISCUSIÓN

En general se ha reportado que existe una correlación negativa entre la inclusión de aceites esenciales, fuentes de ácidos grasos, aceites puros y modificados con respecto a la producción de gas *in vitro* (Mohammed *et al.* 2004, Abdalla *et al.* 2012). En este sentido, Castagnino *et al.* (2015) encontraron que en tratamientos con aceites poliinsaturados y glicerol, la producción de gas *in vitro* disminuye del 12 al 20 % y afecta los parámetros de fermentación. Al respecto Nanon *et al.* (2014), encontraron que utilizando aceites esenciales de pasto limón (*Cymbopogon citratus*), ajo (*Allium sativum*) y jengibre (*Zingiber officinale*) en dosis de 200 mg kg⁻¹ de MS, la producción de gas y digestibilidad se mantuvieron en un nivel alto, por lo que los aceites favorecieron la producción de gas *in vitro*, aunque en proporciones menores a la utilizadas en el presente estudio. Por otra parte, se ha reportado que los aceites de canola (*Brassica napus*) y girasol (*Helianthus annuus*) poseen un perfil de ácidos grasos

similar a los de TP y AG, y son capaces de aumentar la eficiencia en el crecimiento bacteriano en niveles inferiores al 5 % sobre la materia seca (Dewhurst *et al.* 2000), por lo que favorecen la producción de gas. No obstante, en el presente estudio la producción de gas se redujo a partir del tratamiento con 4 % de aceite.

Aunque en los aceites de TP y AG que se evaluaron en este trabajo, no se realizaron análisis químicos para metabolitos secundarios, se observó un comportamiento similar al de algunos aceites esenciales, encontrados por Lin *et al.* (2013) al utilizar aceites esenciales combinados con fumarato, quienes observaron una disminución paulatina en la producción de gas, en función de la adición de dichos aceites, siendo significativa al agregar 200 mg L⁻¹ de solución, con una producción promedio de gas de 91 ml, aunque con menor cantidad de sustrato (750 mg) con respecto al presente estudio (999 mg).

En cuanto a la disminución de la metanogénesis, algunos autores han encontrado una reducción lineal entre la producción de metano *in vitro* y el aumento en la proporción de aceites (Sallam *et al.* 2010, Grainger y Beauchemin 2011). En este tópico existe una mayor variabilidad de resultados, ya que aspectos como el tipo de forraje, cantidad, tipo de aceite, perfil de ácidos grasos y metodología de cul-

tivo influyen; por lo que resulta difícil establecer un parámetro de referencia sobre el nivel de inclusión y la respuesta en la reducción de metano. En la presente investigación se encontró efecto de la dosis, sin que el tipo de aceite afectara la metanogénesis, por lo que ambos aceites se comportaron de manera similar. En general, algunos estudios sugieren que la cantidad y tipo de ácidos grasos poseen diferente potencial reductor de la metanogénesis; al respecto, Soliva *et al.* (2003), encontraron un mayor resultado en la mitigación de metano *in vitro* utilizando ácido láurico no esterificado (C12) en comparación con el ácido mirístico (C14). En el presente trabajo, no se detectó diferencia entre los dos tipos de aceites en la producción de gas y de metano, dada la similitud en el perfil de los ácidos grasos.

En algunas situaciones un alto nivel de aceite en cultivos ruminales, no se relaciona de forma directa con la producción de metano. Al respecto Storlien *et al.* (2012), reportaron que con 5 % de aceites de canola, girasol e hígado de bacalao, se tuvo una producción de gas similar entre el control y los tratamientos, pero no tuvo efecto sobre la producción de metano, lo que contrasta con lo observado en el presente estudio, donde la inclusión del 3 % de aceites de TP y AG, tuvo una producción de gas similar al control, pero redujo de forma significativa la producción de CH₄. En condiciones *in vitro*, la reducción de la metanogénesis puede estar ligada a la reducción de la fermentación, producción de gas, y digestibilidad del sustrato por niveles altos de aceite (Patra y Yu 2012), lo que no se observó en el presente trabajo, ya que con 3 % de ambos aceites, se mantuvo la producción de gas y digestibilidad del forraje, afectando únicamente la producción de CH₄.

El porcentaje de DIVMS y DIVFDN fueron afectados con niveles altos de aceite (4 al 6 %), ambas variables mostraron un comportamiento similar, aspecto que coincide con lo reportado por Nanon *et al.* (2014), quienes encontraron un comportamiento lineal y cuadrático de DIVMS y DIVFDN con aceite de jengibre, similar al del presente estudio. Sin embargo, al comparar los indicadores de

digestibilidad del presente trabajo contra los reportados por Martínez *et al.* (2006) con aceites de plantas del género *Thymus*, se infiere que la naturaleza de los aceites tiene un impacto directo sobre la fermentación y digestibilidad del forraje, ya que estos autores observaron una disminución del 30 % en la digestibilidad con niveles bajos del 2 % de aceite. Es posible que la baja digestibilidad se relacione con la presencia de metabolitos secundarios, que pueden ser tóxicos para la flora ruminal.

Uno de los principales retos en materia de mitigación de metano a nivel experimental, radica en el hecho de que aunque se logre mitigar la metanogénesis se debe evitar una disminución lineal de la digestibilidad, ya que guarda una relación directa con la productividad animal y el consumo voluntario de alimento (Beauchemin y McGinn 2006).

El presente estudio es el primero sobre comportamiento biológico del aceite de *Thevetia peruviana* en fermentación *in vitro*, dados los antecedentes de toxicidad de la planta a nivel de sus hojas, tallos, inflorescencias y frutos (Odhiambo *et al.* 2012). Los parámetros de producción de gas y digestibilidad obtenidos con los aceites de TP y AG del presente trabajo, indican que se puede considerar el uso de ambos aceites en estudios *in vivo* que contemplen su evaluación como aditivos alimenticios y mitigadores de la metanogénesis.

CONCLUSIONES

Al adicionar 3 % de aceite de *Thevetia peruviana* y de frutos de aguacate en cultivos ruminales con pasto estrella de África, se puede reducir la metanogénesis sin afectar la producción de gas y la digestibilidad del forraje *in vitro*. Además de que se observa un efecto lineal y cuadrático de la dosis de aceite sobre la producción de metano y digestibilidad del forraje.

LITERATURA CITADA

- Abdalla AL, Louvandini H, Abdallah SM, Da Silva CI, Tsai MS, De Oliveira A (2012) *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. *Tropical Animal Health and Production* 44: 953-964.
- AOAC (2006) Official Methods of Analyses 18th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. Method 930.15 17th ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA (2008) Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 48: 21-27.
- Beauchemin KA, McGinn SM (2006) Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science* 84: 1489-1496.
- Beauchemin KA, McGinn SM, Petit HV (2007) Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science* 87: 431-440.
- Benchaar C, Greathead H (2011) Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 338-355.
- Castagnino PS, Meesana JD, Fiorentini G, De Jesús RB, San Vito E, Carvalho IPC, et al. (2015) Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 201: 14-15.
- Cottle DJ, Nolan JV, Wiedemann SG (2011) Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* 51: 491-514.
- Dewhurst RJ (2013) Greenhouse gasses and animal agriculture conference, Dublin, 2013. *Animal* 7: s2: 203-205.
- Dewhurst RJ, Davies D R, Merry RJ (2000) Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85: 1-21.
- Dos Santos MAZ, Alicieo TVR, Pereira CMP, Ramis-Ramos G, Mendonca CRB (2014) Profile of bioactive compounds in avocado pulp oil: influence of the drying processes and extraction methods. *Journal American Oil Chemistry Society* 91: 19-27.
- Eckard RJ, Grainger C, De Klein CAM (2010) Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Science* 130: 47-56.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- FAO (2009) The state of food and agriculture, Livestock in the balance. FAO, Rome, Italy 163p.
- García E (1964) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana): México, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía. 91p.
- Gerber PJ, Henderson B, Makkar HPS (2013) Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera. FAO, Roma, Italia 231p.
- Grainger C, Beauchemin KA (2011) Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 308-320.

- Hook SE, Wright AD, McBride BW (2010) Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. Volumen 2010, Article ID 945785. 11p.
- Hristov A N, Lee C, Hristova RA, Huhtanen P, Firkins J (2012) A meta-analysis of the variability in continuous culture rumen fermentation and digestibility data. *Journal of Dairy Science* 95: 5299-5307.
- Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, et al. (2013) Special topics-mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations; review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science* 91: 5045-5069.
- Ibiyemi SA, Fadipe MO, Akinremi OO, Bako SS (2002) Variation in oil composition of *Thevetia peruviana* Juss "Yellow oleander" fruit seeds. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 6: 61-65.
- Kareru PG, Keriko JM, Kenji GM, Gachanja AN (2010) Anti-termite and antimicrobial properties of paint made from *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. oil extract. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4: 87-89.
- Kong Y, He M, McAlister T, Seviour R, Forster R (2010) Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of microbial communities in the rumens of cattle fed different diets. *Applied Environmental Microbiology* 76: 6933-6938.
- Kumar S, Kumar P, Carro MD, Griffith GW, Dagar SS, Puniya M, et al. (2014) New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology Biotechnology* 98: 31-44.
- Lin B, Wang JH, Lu Y, Liang Q, Liu JX (2013) In vitro rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 1-9.
- Mao HL, Wang JK, Zhou YY, Liu JX (2010) Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129: 56-62.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau M (2010) Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351-365.
- Martinez S, Madrid J, Hernandez F, Megias MD, Sotomayor JA, Jordan MJ (2006) Effect of thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 54: 6598-6602.
- Mohammed N, Ajisaka N, Lila ZA, Hara K, Mikuni K, Hara K et al. (2004) Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *Journal of Animal Science* 82: 1839-1846.
- Nanon A, Suksombat W, Yang WZ (2014) Effects of essential oils supplementation on *in vitro* and *in situ* feed digestion in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology* 196: 50-59.
- Odhiambo PO, Makobe, Boga MH, Miugai A, Schumacher M, Kiesecker H (2012) Phyto-chemical screening of wild types and tissue cultured yellow oleander *Thevetia peruviana* Pers.K.Schum in Kenya. *Advances in Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 1: 1-2
- Ortiz MA, Dorantes M, Galíndez J, Guzmán RI (2003) Effect of different extraction methods on fatty acids, volatile compounds, and Physical and chemical properties of avocado (*Persea Americana* Mill.). *Oil* 51: 2216-221.
- Patra AK, Yu Z (2012) Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 78: 4271-4280.

- Sallam SMA, Abdelgaleil SAM (2010) Efecto de diferentes niveles de aceite esencial de cítrico y su componente activo en la fermentación microbiana ruminal y la producción *in vitro* de metano. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 44: 373-378.
- Sallam SMA, Bueno ICS, Brigide P, Godoy PB, Vitti DMSS, Abdalla AL (2009) Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* rumen fermentation and methane production. *Options Mediterraneennes* 85: 267-272.
- Statistical Analysis System SAS (2006) User's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute.
- Soliva CR, Hindrichsen IK, Meile L, Kreuzer M, Machmuller A (2003) Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* 37: 35-39.
- Storlien TM, Harstad OM, Narvaez N, Wang Y, McAllister TA (2012) Effects of different oils and plant extracts on *in vitro* ruminal methane production. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A* 62: 300-304.
- Theodorou MK, Williams BA, Dahona MS, McAllan AB, 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: 185-197.
- Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Yanty NAM, Marikkar JMN, Long K (2011) Effect of varietal differences on composition and thermal characteristics of avocado oil. *Journal American Oil Chemistry Society* 88: 1997-2003.