


## Efecto de aceites esenciales sobre la producción de metano en la fermentación *in vitro* de pasto llanero



Paulino Sánchez-Santillán <sup>a</sup>

Luis Antonio Saavedra-Jiménez <sup>a</sup>

Nicolás Torres-Salado <sup>a</sup>

Jerónimo Herrera-Pérez <sup>a</sup>

Marco Antonio Ayala-Monter <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Guerrero. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2, Carretera Acapulco-Pinotepa Nacional, kilómetro 197, Cuajinicuilapa, 41940, Guerrero, México.

\* Autor de correspondencia: [maamonter@hotmail.com](mailto:maamonter@hotmail.com)

### Resumen:

El objetivo fue evaluar el uso creciente de aceite de ajo, ajonjolí y canela en la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro* de pasto llanero con 60 días de rebrote. Se evaluó la adición de 0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10 % de aceite de ajo, canela o ajonjolí en una fermentación *in vitro* usando como sustrato pasto llanero con 60 días de rebrote. Las variables evaluadas fueron producción acumulada de CH<sub>4</sub> a las 12, 24, 36, 48 y 72 h, degradación de materia seca (DMS) y los estimadores de cinética de producción de CH<sub>4</sub> ( $A$ = potencial de producción de CH<sub>4</sub>,  $b$ = tasa constante de producción de CH<sub>4</sub> y  $k$ = tiempo lag). La producción de CH<sub>4</sub> y DMS se analizaron con un diseño experimental completamente al azar y contraste ortogonal. Los estimadores fueron un análisis descriptivo. El aumento de aceite de ajo y canela redujo linealmente la producción de CH<sub>4</sub> a las 12, 24, 36, 48 y 72 h. La DMS disminuyó linealmente con cualquiera de los tres aceites ( $P<0.05$ ). El mayor valor de  $A$  fue con 2.5 % de aceite de ajo, el mayor valor de  $k$  y  $b$  fue con 10 % de aceite de canela. En conclusión, el uso de aceites

de ajo y canela mostraron una disminución lineal de la producción de CH<sub>4</sub> y DMS de pasto llanero en condiciones *in vitro*.

**Palabras clave:** Aceite de ajo, Aceite de canela, Aceite de ajonjolí, Degradación de materia seca, *in vitro*.

Recibido: 18/10/2022

Aceptado: 26/10/2023

## Introducción

La producción ganadera genera 37 % de las emisiones mundiales de gases de efecto invernadero (GEI) y se espera aumente a 40 % para 2050; de estos GEI, 80.7 % procede de la fermentación entérica de los rumiantes<sup>(1,2)</sup>. Los principales GEI producidos por rumiantes son metano (CH<sub>4</sub>) entérico y en estiércol, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O)<sup>(3)</sup>. El CH<sub>4</sub> es un GEI que contribuye a la formación de ozono troposférico; además, tiene una vida corta (9 a 12 años), pero es 25 veces más nocivo que el CO<sub>2</sub>, por lo que su reducción ayuda a mitigar los efectos adversos del cambio climático<sup>(1,2)</sup>.

Las estrategias de mitigación de GEI se encausan a no afectar el rendimiento animal, reducir el impacto ambiental, mejorar la productividad y rentabilidad de los sistemas de producción<sup>(1)</sup>. Debido a esto, los aditivos deben ser capaces de modificar la fermentación del rumen para mejorar la eficiencia del uso de la energía mientras disminuyen la metanogénesis del rumen<sup>(4)</sup>. En la actualidad, se han identificado alrededor de 200,000 metabolitos secundarios de plantas como moduladores potenciales del microbiota ruminal, específicamente en la reducción de pérdida de energía vía la síntesis de CH<sub>4</sub><sup>(1)</sup>.

El aceite esencial (AE) es una mezcla compleja de sustancias químicas volátiles o aromáticas lipofílicas, específicas de plantas; sus constituyentes son terpenoides, fenilpropanoides, monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes, aldehídos, éteres, ésteres, cetonas y fenoles<sup>(1,5)</sup>. Estos aceites poseen propiedades antioxidantes e inducen cambios en el microbioma ruminal, dando como resultados la reducción de CH<sub>4</sub>, aumento en propionato o proteína de derivación ruminal<sup>(1,4,6)</sup>, efecto antimicrobiano de bacterias, hongos y protozoarios, así como la disminución de la digestibilidad de la materia seca (MS) y la fermentación ruminal<sup>(4)</sup>, inhibición de la desaminación en aminoácidos, reducción nitrógeno amoniacal y acetato<sup>(5)</sup>, e influyen en las vías de electrones afectando la integridad de las membranas celulares<sup>(1,2)</sup>. La reducción de la producción de CH<sub>4</sub> entérico con el uso de AE es por la reducción en la

producción de hidrógeno (sumideros alternativos), inhibición directa de arqueas e interrupción de la simbiosis entre protozoos y arqueas<sup>(1)</sup>.

El aceite de ajo (*Allium sativa*) presenta un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias gram-negativas y gram-positivas<sup>(7)</sup>; sus compuestos bioactivos son sulfuros orgánicos, saponinas, compuestos fenólicos y polisacáridos, alicina, S-alilcisteína, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo, dialilo sulfuro y ajoeno<sup>(8)</sup>. El aceite de canela (*Cinnamomum verum*) tiene efecto antimicrobiano por su contenido de transcinamaldehído y actividad antioxidante por sus compuestos fenólicos y polifenólicos<sup>(9)</sup>. Por su parte, el aceite de ajonjolí (*Sesamum indicum*) contiene ácido oleico y linoleico, tocoferol, sesamina, sesamolina, polifenoles, fitoesteroles, flavonoides y lignanos que tienen efectos antiinflamatorios y antimutagénicos<sup>(10)</sup>.

La eficiencia de la fermentación ruminal propicia la búsqueda de alternativas naturales para mitigar las emisiones de GEI sin comprometer la productividad del ganado; la concentración de CH<sub>4</sub> atmosférico sigue en aumento, por lo que se requiere de estrategias que ayuden a disminuir su producción. La hipótesis planteada fue que la adición de los aceites de ajo, ajonjolí y canela disminuyen la producción de CH<sub>4</sub> durante la fermentación ruminal *in vitro* del sustrato pasto llanero con 60 días de rebrote. De esta manera, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el uso creciente de dosis de aceite de ajo, ajonjolí y canela en la fermentación ruminal *in vitro* de pasto llanero con 60 días de rebrote como sustrato en la producción de metano y degradación de materia seca.

## Material y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 2 ubicada en la cabecera municipal de Cuajinicuilapa, Guerrero, México.

### Aceites y sustrato

Los aceites esenciales fueron de ajo (Yerbatex), ajonjolí (Yerbatex) y canela (Yerbatex). Las proporciones de aceite evaluadas fueron 0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 % de aceite. El pasto llanero (*Brachiaria dictyoneura*) se cosechó a los 60 días de rebrote. El pasto se deshidrató a 60 °C por 48 h en una estufa (FELISA® FE-293A, México) y se molió a tamaño de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Mill (Thomas Scientific®, Swedesboro, NJ, USA). La composición bromatológica del pasto fue 22.4 % de materia seca (MS), 3.4 % de proteína cruda (PC), 71.1 % de fibra detergente neutro (FDN), 42.1 % de fibra detergente ácido (FDA) y 8.7 % de cenizas (Ce).

## Técnica de producción de gas *in vitro*

El medio de cultivo para los ensayos *in vitro* consistió en dos tercios de una solución buffer-mineral reducida y un tercio de fluido ruminal fresco<sup>(11)</sup>. La solución buffer-mineral reducida contenía: 150 ml de solución mineral I [6 g  $K_2HPO_4$  (Sigma) en 1,000 ml de  $H_2O$  destilada], 150 ml de solución mineral II [6 g  $KH_2PO_4$  (Sigma) + 6 g  $(NH_4)_2SO_4$  (Merck) + 12 g NaCl (Sigma-Aldrich) + 2.45 g  $MgSO_4$  (Sigma) + 1.6 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  (Sigma) en 1,000 ml de  $H_2O$  destilada], 100 ml de solución al 8 % de  $Na_2CO_3$  (Merck), 100 ml de solución reductora [0.1 g L-cisteína (Sigma) + 0.1 g  $Na_2S \cdot 9H_2O$  (Meyer) + 2 ml NaOH (2N; Meyer) en 100 ml de  $H_2O$  destilada] y 2 ml de resazurina a 0.1 % (Sigma-Aldrich). El fluido ruminal fresco se obtuvo de un bovino provisto de cánula ruminal que pastoreó en praderas con pasto pangola, y se filtró con una manta de cielo para eliminar las macropartículas de materia orgánica. El bovino se manejó de acuerdo al reglamento interno de bioética y bienestar de la Universidad Autónoma e Guerrero, con fundamento en las normas oficiales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-051-ZOO-1995).

Posteriormente, en un vial serológico (120 ml) se colocaron las siguientes relaciones de aceite y pasto llanero molido directo en el vial: 0 % (1 g de pasto), 2.5 % (0.025 g aceite y 0.975 g de pasto), 5 % (0.05 g aceite y 0.95 g de pasto), 7.5 % (0.075 g de aceite y 0.925 g de pasto) y 10 % (0.1 g de aceite y 0.9 g de pasto). A cada vial se agregaron 50 ml del medio de cultivo, bajo flujo continuo de  $CO_2$ , para mantener condiciones de anaerobiosis. El vial se cerró con un tapón de neopreno y arillo de aluminio con centro removible y se le consideró un biodigestor. Los biodigestores se incubaron en baño maría a 39 °C por 72 h.

## Producción de metano

La producción de metano ( $CH_4$ ) se determinó usando una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos. Las agujas se usaron para acoplar un biodigestor con un vial-trampa que contenía NaOH (2N); el cual se colocó de manera inversa en una probeta modificada que sirvió para coleccionar la solución NaOH (2N) desplazada por el  $CH_4$  producido durante la incubación, a través de la aguja hipodérmica colocada como válvula de salida. La producción de  $CH_4$  se midió a las 0, 12, 24, 36, 48 y 72 h<sup>(12,13)</sup>. El principio del uso de esta técnica es porque los principales gases producidos a partir de los productos finales de la fermentación microbiana *in vitro* son  $CO_2$  y  $CH_4$ , dado que el resto de los gases producidos en técnicas *in vitro* son trazas<sup>(14)</sup>. Así mismo, el NaOH tiene la capacidad de capturar el  $CO_2$ , ya que su reacción genera  $HCO_3^-$ <sup>(15)</sup> por lo que la producción de  $CH_4$  se toma como los mililitros desplazados de solución de NaOH.

## Características fermentativas

A las 72 h de incubación se determinó pH, nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) y degradación de materia seca (DMS). El pH del medio de cultivo se midió con un potenciómetro (Hanna<sup>®</sup> HI2211, Italia; calibración pH 7 y 4). Para nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) se tomó 1 ml del medio contenido en el biodigestor y se mezcló con 0.25 ml de ácido metafosfórico al 25 % (Meyer<sup>®</sup>; proporción 4:1) en un tubo Eppendorf de 2 ml (Neptune<sup>®</sup>, México). La muestra del tubo se centrifugó 25 min a 3,500 xg y el sobrenadante se recuperó en viales de 2 ml. Un volumen de 20 µl de este sobrenadante se mezcló con 1 ml de solución fenol [10 mg de Na<sub>2</sub>(NO)Fe(CN)<sub>5</sub>.H<sub>2</sub>O (Meyer<sup>®</sup>) + 10 g de cristales de fenol (Meyer<sup>®</sup>) aforado en 1,000 ml de agua destilada] y 1 ml de solución hipoclorito [7.5 g de NaOH (Reasol<sup>®</sup>) + 21.3 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Meyer<sup>®</sup>) + 15 ml de hipoclorito (5%; Reasol<sup>®</sup>) aforado a 1,000 ml con agua destilada]. La mezcla se incubó 30 min a 37 °C en baño María (Shel Lab<sup>®</sup> 1227, USA). Posteriormente, 5 ml de agua destilada se adicionaron para diluir y se agitaron con un vórtex (Genie 2 G-560, USA). La absorbancia se midió a 630 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway<sup>®</sup> 6850, USA) calibrando con un método ( $r^2=0.9994$ ) de concentración de nitrógeno<sup>(16)</sup>. La DMS se cuantificó al filtrar la muestra sólida residual del biodigestor usando bolsas ANKOM<sup>®</sup> previamente secadas a peso constante. Las bolsas con muestra se secaron a 60 °C por 24 h en una estufa. La degradación de la materia seca *in vitro* (DMS) se calculó usando la fórmula % DMS= (muestra inicial - muestra residual / muestra inicial) \* 100<sup>(17)</sup>.

## Cinética de producción de metano

Los valores de la producción de CH<sub>4</sub> acumulado se usaron para estimar la cinética de producción de CH<sub>4</sub> mediante el modelo Gompertz<sup>(18)</sup>. Los estimadores *A*, *b* y *k* se estimaron mediante un análisis de regresión no lineal, utilizando el procedimiento PROC NLMIXED del paquete estadístico SAS<sup>(19)</sup>. El modelo utilizado fue:

$$Y = A \exp [-b] [\exp (-k t)];$$

Donde:

*Y*= volumen de CH<sub>4</sub> en el tiempo *t* (ml g<sup>-1</sup> de MS);

*A*= potencial de producción de CH<sub>4</sub> total cuando  $t = \infty$  (ml g<sup>-1</sup> de MS);

*b*= tasa constante de producción de CH<sub>4</sub> del material potencialmente degradable (ml h<sup>-1</sup>);

*k*= tiempo lag (h), factor constante de eficiencia microbiana, definido como el intercepto del eje tiempo de la línea de la tangente en el punto de inflexión;

*t*= tiempo de incubación.

## Análisis estadístico

La producción acumulada de metano a las 12, 24, 36, 48 y 72 h, así como las características fermentativas *in vitro* para cada aceite (ajo, ajonjolí y canela) se analizaron con un diseño completamente al azar con el procedimiento GLM de SAS<sup>(19)</sup>. Los valores promedio se compararon con la prueba de Tukey ( $P<0.05$ ). La respuesta al aumento creciente del aceite se calculó mediante contrastes ortogonales lineales y cuadráticos. Cabe destacar, en los estimadores de cinética de producción de CH<sub>4</sub> se realizó un análisis descriptivo.

## Resultados

La producción de CH<sub>4</sub> disminuyó en forma lineal a las 12, 24, 36, 48 y 72 h de fermentación del pasto llanero ( $P<0.05$ ) conforme aumento la adición de aceite de ajo (Cuadro 1) y de canela (Cuadro 2). El aceite de ajonjolí no presentó contraste lineal ni cuadrático en la producción de CH<sub>4</sub> a las 12, 24, 36, 48 y 72 h de fermentación del pasto ( $P>0.05$ ) conforme aumento su adición (Cuadro 3). Esto indica que el aceite de ajo y de canela reducen la producción de metano en pruebas *in vitro*. Sin embargo, cuando se usó el aceite de ajo, la tendencia en la disminución y diferencia entre niveles de inclusión se mostró a partir de 7.5 % (Cuadro 1). En el caso del aceite de canela, el efecto en la disminución fue a partir del 2.5 % de inclusión (Cuadro 2).

**Cuadro 1:** Efecto del nivel de aceite de ajo en la producción de CH<sub>4</sub> y características fermentativas *in vitro* del pasto llanero con 60 días de rebrote

Variable	Inclusión de aceite de ajo					EEM	Tukey test	Lineal	Cuadrático
	0 %	2.5 %	5.0 %	7.5 %	10 %				
Me12	11.49 <sup>a</sup>	11.61 <sup>a</sup>	11.15 <sup>a</sup>	8.64 <sup>b</sup>	9.62 <sup>ab</sup>	0.35	0.0027	0.0013	0.8488
Me24	24.99 <sup>ab</sup>	28.01 <sup>a</sup>	25.43 <sup>ab</sup>	21.96 <sup>b</sup>	23.31 <sup>b</sup>	0.62	0.0027	0.0058	0.1887
Me36	34.48 <sup>ab</sup>	37.24 <sup>a</sup>	33.73 <sup>ab</sup>	28.81 <sup>c</sup>	31.08 <sup>bc</sup>	0.84	0.0007	0.0007	0.5140
Me48	38.95 <sup>b</sup>	43.73 <sup>a</sup>	37.11 <sup>bc</sup>	34.21 <sup>c</sup>	36.63 <sup>bc</sup>	0.88	<0.0001	<0.0001	0.7042
Me72	43.98 <sup>b</sup>	48.86 <sup>a</sup>	41.53 <sup>bc</sup>	39.61 <sup>c</sup>	40.33 <sup>c</sup>	0.92	<0.0001	<0.0001	0.2223
pH	6.01 <sup>c</sup>	6.10 <sup>b</sup>	6.11 <sup>ab</sup>	6.14 <sup>ab</sup>	6.17 <sup>a</sup>	0.02	<0.0001	<0.0001	0.0912
DMS	59.48	59.37	58.31	55.31	53.74	0.93	0.1815	0.0396	0.9975
N-NH <sub>3</sub>	9.75	9.75	14.12	11.83	11.00	0.92	0.5416	0.5451	0.3324

Me12= producción de metano a 12 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me24= producción de metano a 24 h de fermentación, Me36= producción de metano a 36 h de fermentación, Me48= producción de metano a 48 h de fermentación, Me72= producción de metano a 72 h de fermentación, pH= potencial de iones hidrógeno, DMS= porcentaje de degradación de materia seca, N-NH<sub>3</sub>= mg dl<sup>-1</sup> de nitrógeno amoniacal, EEM= error estándar de la media.

<sup>a,b,c</sup> Valores promedio con distinta letra en una misma fila son diferentes ( $P<0.05$ ).

**Cuadro 2:** Efecto del nivel de aceite de canela en la producción de CH<sub>4</sub> y características fermentativas *in vitro* del pasto llanero con 60 días de rebrote

Variable	Inclusión de aceite de canela					EEM	Tukey test	Lineal	Cuadrático
	0 %	2.5 %	5.0 %	7.5 %	10 %				
Me12	11.66 <sup>a</sup>	10.25 <sup>ab</sup>	9.11 <sup>bc</sup>	8.28 <sup>c</sup>	8.14 <sup>c</sup>	0.37	<0.0001	<0.0001	0.0374
Me24	25.32 <sup>a</sup>	23.91 <sup>ab</sup>	22.79 <sup>bc</sup>	20.88 <sup>c</sup>	23.68 <sup>ab</sup>	0.42	0.0004	0.0010	0.0009
Me36	34.65 <sup>a</sup>	31.77 <sup>b</sup>	30.15 <sup>bc</sup>	27.73 <sup>c</sup>	31.45 <sup>b</sup>	0.64	<0.0001	0.0001	0.0001
Me48	38.64 <sup>a</sup>	36.56 <sup>ab</sup>	34.71 <sup>bc</sup>	33.13 <sup>c</sup>	36.27 <sup>ab</sup>	0.54	0.0004	0.0009	0.0004
Me72	43.31 <sup>a</sup>	39.29 <sup>b</sup>	38.92 <sup>b</sup>	38.53 <sup>b</sup>	40.71 <sup>b</sup>	0.51	0.0007	0.0066	0.0001
pH	6.01 <sup>c</sup>	6.11 <sup>b</sup>	6.20 <sup>a</sup>	6.16 <sup>ab</sup>	6.22 <sup>a</sup>	0.02	<0.0001	<0.0001	0.0035
DMS	59.48 <sup>a</sup>	58.36 <sup>a</sup>	56.88 <sup>ab</sup>	54.58 <sup>b</sup>	55.49 <sup>b</sup>	0.53	0.0007	<0.0001	0.1621
N-NH <sub>3</sub>	9.75 <sup>a</sup>	7.25 <sup>a</sup>	8.50 <sup>a</sup>	8.50 <sup>a</sup>	8.91 <sup>a</sup>	0.33	0.2040	0.8484	0.0983

Me12= producción de metano a 12 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me24= producción de metano a 24 h de fermentación, Me36= producción de metano a 36 h de fermentación, Me48= producción de metano a 48 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me72= producción de metano a 72 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), pH= potencial de iones hidrógeno, DMS= porcentaje de degradación de materia seca, N-NH<sub>3</sub>= mg dl<sup>-1</sup> de nitrógeno amoniacal, EEM = error estándar de la media.

<sup>a,b,c</sup> Valores promedio con distinta letra en una misma fila son diferentes ( $P<0.05$ ).

**Cuadro 3:** Efecto del nivel de aceite de ajonjolí en la producción de CH<sub>4</sub> y características fermentativas *in vitro* del pasto llanero con 60 días de rebrote

Variable	Inclusión de aceite de ajonjolí					EEM	Tukey test	Lineal	Cuadrático
	0 %	2.5 %	5.0 %	7.5 %	10 %				
Me12	11.66	10.59	10.51	10.80	9.99	0.22	0.1939	0.0524	0.6139
Me24	25.32	25.28	23.84	24.48	24.42	0.30	0.5145	0.2516	0.4369
Me36	34.65	32.11	32.60	33.12	32.93	0.31	0.0737	0.1977	0.0461
Me48	38.64	37.57	37.86	38.52	37.74	0.21	0.4146	0.5729	0.5973
Me72	43.31	42.70	43.12	42.49	43.29	0.24	0.8175	0.9001	0.4485
pH	6.01 <sup>c</sup>	6.13 <sup>b</sup>	6.14 <sup>b</sup>	6.17 <sup>ab</sup>	6.22 <sup>a</sup>	0.02	<0.0001	<0.0001	0.0085
DMS	59.48 <sup>a</sup>	57.88 <sup>ab</sup>	56.12 <sup>b</sup>	53.33 <sup>c</sup>	53.29 <sup>c</sup>	0.68	<0.0001	<0.0001	0.2876
N-NH <sub>3</sub>	9.75	9.75	8.91	9.75	8.91	0.35	0.8964	0.5684	1.000

Me12= producción de metano a 12 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me24= producción de metano a 24 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me36= producción de metano a 36 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me48= producción de metano a 48 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), Me72= producción de metano a 72 h de fermentación (ml g<sup>-1</sup> MS), pH= potencial de iones hidrógeno, DMS= porcentaje de degradación de materia seca, N-NH<sub>3</sub>= mg dl<sup>-1</sup> de nitrógeno amoniacal, EEM= error estándar de la media.

<sup>a,b,c</sup> Valores promedio con distinta letra en una misma fila son diferentes ( $P<0.05$ ).

La degradación de la materia seca (DMS) disminuyó en forma lineal ( $P<0.05$ ) conforme aumentó la inclusión de aceite de ajo (Cuadro 1), canela (Cuadro 2) o ajonjolí (Cuadro 3). Esta disminución se vio reflejada en el valor de pH de los medios de cultivo; ya que el pH aumentó de forma lineal ( $P<0.05$ ) conforme se incrementó la inclusión de aceite de ajo (Cuadro 1), canela (Cuadro 2) y ajonjolí (Cuadro 3).

El contenido de nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ) no presentó ( $P>0.05$ ) efecto lineal o cuadrático, ni diferencias entre niveles de inclusión de aceite de ajo (Cuadro 1), de canela (Cuadro 2) o de ajonjolí (Cuadro 3) conforme se incrementó su inclusión en la fermentación de pasto llanero.

La cinética de fermentación de  $CH_4$  usando el aceite de ajo mostró valores similares en  $A$  y  $k$  cuando se adicionó 5 y 7.5 %, mientras que en  $b$  son menores cuando se adicionó 7.5 y 10 %, respecto a los valores obtenidos sin inclusión de aceite (testigo). En los niveles de inclusión del aceite de ajonjolí muestra que, respecto al testigo, la inclusión de 2.5 % presentó valores inferiores en los estimadores  $A$ ,  $k$  y  $b$ . El contraste, en el estimador  $A$  todos los niveles de inclusión del aceite de canela presentaron valores inferiores al testigo; mientras, en el estimador  $b$  fue la inclusión de 7.5 % y en el estimador  $k$  fue 5 y 7.5 % (Cuadro 4).

**Cuadro 4:** Promedio de los estimadores de la cinética de producción de  $CH_4$  *in vitro* del pasto llanero con 60 días de rebrote adicionada con niveles creciente de aceite de ajo, ajonjolí o canela

Aceite	% inclusión	$A$ (ml g <sup>-1</sup> de MS)	$k$ (h)	$b$ (ml h <sup>-1</sup> )
Testigo	0.0	42.54	3.55	0.077
	2.5	47.50	3.52	0.075
	5.0	42.53	3.47	0.075
Aceite de ajo	7.5	42.55	3.37	0.068
	10.0	43.77	3.35	0.067
	2.5	35.62	3.23	0.071
Aceite de ajonjolí	5.0	44.72	3.91	0.076
	7.5	41.16	3.52	0.078
	10.0	43.45	3.42	0.071
Aceite de canela	2.5	36.61	3.69	0.077
	5.0	39.66	3.49	0.074
	7.5	34.75	3.34	0.064
	10.0	38.98	4.17	0.082

$A$ = potencial de producción de metano total,  $b$ = tasa constante de producción de metano,  $k$ = tiempo lag.



## Discusión

El objetivo de microbiólogos y nutricionistas de rumiantes es manipular los ecosistemas microbianos ruminales para mejorar la eficiencia del consumo de alimento<sup>(7)</sup>. Los aditivos que se usan como inhibidores de CH<sub>4</sub> actúan directamente en la vía de la metanogénesis, de forma que interrumpen el proceso. Los aceites en el ambiente ruminal presentan características tóxicas sobre metanógenos y protozoarios, hidrogenación de los ácidos grasos insaturados (sumidero alternativo para hidrógeno) y cambios en la producción propiónica que conllevan a reducir la producción de CH<sub>4</sub><sup>(20)</sup>.

La disminución en la producción de CH<sub>4</sub> acumulado a los diferentes tiempos medidos por los aceites de ajo y canela se asumen que contienen terpenoides y fenilpropanoides que interactúan en la membrana celular; ya que su naturaleza hidrófoba de los hidrocarburos cíclicos permite que se acumulen en la bicapa lipídica, provocando cambios conformacionales en la estructura de la membrana, lo que provoca pérdida de estabilidad de la membrana celular<sup>(21)</sup>.

Delgadillo-Ruiz *et al*<sup>(5)</sup> hicieron una estimación con modelos no lineales y reportaron producciones de 183, 99 y 141 mM L<sup>-1</sup> de CH<sub>4</sub> cuando se adicionaron 0.1, 0.3 y 0.6 ml de aceite de canela usando como sustrato 41.5 % de alfalfa, 41.5 % paja de trigo y 17 % de un concentrado con base en grano de maíz; valores contrastantes al presente estudio (Cuadro 2), porque no muestran una tendencia a disminuir CH<sub>4</sub> conforme aumentó la adición de aceite de canela. Cobellis *et al*<sup>(3)</sup> reportaron 3.67 ml de CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> de MS en una fermentación *in vitro* de 24 h donde usaron heno de alfalfa como sustrato y adicionaron 1.125 ml L<sup>-1</sup> de medio de cultivo de aceite de canela; valores inferiores al presente estudio, aún respecto al tratamiento testigo (Cuadro 2). Esto por la metodología usada para medición de CH<sub>4</sub>, sustrato, fuente de inóculo, etc<sup>(13)</sup> que influyen en la producción de CH<sub>4</sub>.

En el presente estudio *in vitro* se evaluaron concentraciones de hasta 10 %; sin embargo, el NRC<sup>(22)</sup> menciona que la inclusión de aceites<sup>(22)</sup> no debe superar 7 % de la materia seca de la dieta, porque niveles mayores presentaría problemas con el consumo de materia seca por los niveles elevados de aceites. Motivo por el cual, el aceite de canela podría considerarse en pruebas *in vivo* para evaluar su efecto en la disminución de gases de efecto invernadero, ya que se observaron disminuciones a partir de la inclusión de 2.5 %; mientras que el aceite de ajo fue a partir de 5 % de inclusión.

La adición del aceite de ajo no mostró diferencias en la degradación de la materia seca (DMS) entre niveles de inclusión del aceite; su tendencia en la disminución de sus valores se observó a partir de 5 % de inclusión. Para el caso del aceite de ajonjolí y de canela, a partir de 5 % de inclusión se mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) y su tendencia a disminuir DMS. La disminución

en la DMS se puede asumir a la acumulación de hidrógeno que afectó la degradación de la fibra<sup>(20)</sup> y que los aceites redujeron la degradación de proteína y almidones como respuesta de la inhibición sobre bacterias usadas en el inóculo<sup>(23)</sup>. Así mismo, los ácidos grasos insaturados son tóxicos para las bacterias que hidrolizan fibra, ya que estos ácidos se adhieren a la pared celular<sup>(24)</sup>, lo que disminuye la capacidad de las bacterias para adherirse al pasto e hidrolizarlo.

La fermentación *in vitro* de pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) mostró un decremento lineal de la degradación de materia seca conforme aumentó la adición de aceite de tomillo (50, 250 y 500 ml g<sup>-1</sup>)<sup>(25)</sup>; situación similar a lo reportado en el presente estudio con los tres aceites. Así mismo, Cobellis *et al*<sup>(3)</sup> reportaron valores inferiores en la DMS al presente estudio; dado que publicaron 55 % de DMS en una fermentación *in vitro* donde usaron heno de alfalfa como sustrato y adicionaron 1.125 ml L<sup>-1</sup> de medio de cultivo de aceite de canela.

Los valores de pH en el presente estudio se asumen a la DMS, ya que un producto de su degradación es la producción de ácidos grasos volátiles, los cuales disminuyen el pH; pero al disminuir la DMS conforme se aumentó la concentración de los diferentes aceites evaluados, la producción de ácidos grasos volátiles disminuyó y no afectó el valor de pH. Busquet *et al*<sup>(7)</sup> reportaron un efecto cuadrático en el valor de pH de los medios de cultivo, con una tendencia a aumentar conforme se adicionó mayor cantidad de aceite de ajo en una dieta que contenía 50:50 de forraje: concentrado; comportamiento similar a lo reportado en el presente estudio con los tres aceites.

La concentración de N-NH<sub>3</sub> en el presente estudio es porque los aceites no inhiben el metabolismo de las bacterias productoras de nitrógeno amoniacal<sup>(23)</sup>. Investigadores<sup>(3)</sup> reportaron 13.5 mg dl<sup>-1</sup> de nitrógeno amoniacal en una fermentación *in vitro* de alfalfa con 1.125 ml L<sup>-1</sup> de aceite de canela; valores superiores al presente estudio, porque la alfalfa contiene mayor contenido de proteína que el pasto llanero. Otro estudio reportó<sup>(7)</sup> que el contenido de N-NH<sub>3</sub> no mostró diferencias con respecto al tratamiento que no contenía aceite de ajo; situación similar al presente estudio con los 3 aceites.

Los efectos de estos aceites tienden a ser influenciados por sus componentes, dificultando analizar su efecto sobre la nutrición de rumiantes; por lo que se requieren posteriores estudios donde se identifiquen los metabolitos que contiene cada aceite para poder establecer el efecto real de cada uno sobre la fermentación de los forrajes, como principales productores de metano, dada la estequiometría fermentativa.

La ecuación de Gompertz modificada es un modelo común para la producción de CH<sub>4</sub> mediante la degradación de un sustrato orgánico simple<sup>(26)</sup>. De modo que existen en la literatura diversos estudios donde se usó este modelo para estimar la producción de CH<sub>4</sub>. He

*et al*<sup>(27)</sup> aplicaron un modelo Gompertz modificado y un modelo cinético de primer orden para evaluar la producción de CH<sub>4</sub> durante la fermentación *in vitro* de la paja de trigo usando fluido de toros y novillonas como inóculo; sus resultados presentaron valores menores en  $A$  (22 ml CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>) y  $k$  (0.945 h), así como mayores en  $b$  (0.105 ml h<sup>-1</sup>). En otro estudio<sup>(28)</sup> evaluaron el potencial de CH<sub>4</sub> y la tasa de producción de CH<sub>4</sub> de la corteza del tallo, médula del tallo y hojas de rastrojo de maíz de la digestión anaerobia discontinua, reportando valores superiores al presente estudio en  $A$  (204.8 ml CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>) y menores en  $k$  (0.1553 h). Zhang *et al*<sup>(26)</sup> reportaron valores superiores al presente estudio, ya que publicaron  $A$  de 94.38 ml CH<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>,  $k$  de 12.38 h y  $b$  de 2.46 ml h<sup>-1</sup> en una fermentación de estiércol de vaca con rastrojo de maíz. Con las diferencias en los estimadores reportados por otros autores<sup>(26,27,28)</sup> usados para la comparación y las del presente estudio, se asume que la adición o no de aceites esenciales con propiedad anti-metagenómicas, depende de las condiciones en las cuales se realizaron los experimentos y los sustratos utilizados, ya que ellos influyen directamente en la cinética de producción de metano.

Por lo que la modelación de la producción de CH<sub>4</sub> bajo las condiciones del presente estudio fue importante, porque sirven para el diseño, la construcción y la aplicación de procesos químicos o bioquímicos. Además, describen las características del proceso y permiten su posterior optimización<sup>(29)</sup>.

## Conclusiones e implicaciones

La adición del aceite de ajo o canela en la fermentación *in vitro* de pasto llanero disminuye la producción de metano y la degradación de la materia seca. El aceite de ajonjolí no presenta actividad anti-metanogénica bajo las condiciones del presente estudio, pero reduce la degradación *in vitro* de la materia seca.

### Agradecimientos

Al cuerpo académico “Producción Sustentable de Rumiantes en el Trópico” por el financiamiento del presente proyecto. Al alumno Adrián Medina Calvo por su apoyo en el trabajo realizado en el laboratorio como parte de sus prácticas profesionales de la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Guerrero.

### Conflicto de interés

Los autores declaramos que no existe un conflicto de intereses en el presente manuscrito.

**Literatura citada:**

1. Jiménez-Ocampo R, Montoya-Flores MD, Pámanes-Carrasco G, Herrera-Torres E, Arango J, Estarrón-Espinosa M, *et al.* Impact of orange essential oil on enteric methane emissions of heifers fed bermudagrass hay. *Front Vet Sci* 2022;9:863910.
2. Becker F, Spengler K, Reinicke F, Heider-van Diepen C. Impact of essential oils on methane emissions, milk yield, and feed efficiency and resulting influence on the carbon footprint of dairy production systems. *Environ Sci Pollut Res* 2023;30(17):48824-48836.
3. Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Marcotullio MC, Yu Z. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol* 2016;215:25-36.
4. Günal M, Pinski B, AbuGhazaleh AA. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. *Ital J Anim Sci* 2017;16(3):500-506.
5. Delgadillo-Ruiz L, Bañuelos-Valenzuela R, Gallegos-Flores P, Echavarría-Cháirez F, Meza-López C, Gaytán-Saldaña N. Modificación de la fermentación ruminal *in vitro* para mitigación de metano mediante la adición de aceites esenciales de plantas y compuestos terpenoides. *Abanico Vet* 2021;11:2020-2050.
6. Belanche A, Newbold CJ, Morgavi DP, Bach A, Zweifel B, Yáñez-Ruiz DR. A Meta-analysis describing the effects of the essential oils blend agolin ruminant on performance, rumen fermentation and methane emissions in dairy cows. *Animals* 2020;10(4):620.
7. Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Carro MD, Kamel C. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 2005;88(12):4393-4404.
8. Bar M, Binduga UE, Szychowski KA. Methods of isolation of active substances from garlic (*Allium sativum* L.) and its impact on the composition and biological properties of garlic extracts. *Antioxidants* 2022;11(7):1345.
9. Wong YC, Ahmad-Mudzaqqir MY, Wan-Nurdiyana WA. Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum Zeylanicum*). *Orient J Chem* 2014;30(1):37-47.
10. Atefi M, Entezari MH, Vahedi H, Hassanzadeh A. The effects of sesame oil on metabolic biomarkers: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Diabetes Metab Disord* 2022;21(1):1065-1080.

11. Hernández-Morales J, Sánchez-Santillán P, Torres-Salado N, Herrera-Pérez J, Rojas-García AR, Reyes-Vázquez I, *et al.* Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. Rev Mex Cienc Pecu 2018;9(1):105-120.
12. Herrera-Pérez J, Velez-Regino LG, Sánchez-Santillán P, Torres-Salado N, Rojas-García AR, Maldonado-Peralta M. Fermentación *in vitro* de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfalos de agua en sustratos fibrosos. Rev MVZ Córdoba 2018;23(3):6860-6870.
13. Torres-Salado N, Sánchez-Santillán P, Rojas-García RA, Almaraz-Buendía I, Herrera-Pérez J, Reyes-Vázquez I, *et al.* *In vitro* gas production and fermentative characteristics of ruminal cellulolytic bacterial consortia of water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Suizo-Cebu cow. Agrociencia 2019;53(2):145-159.
14. Amanzougarene Z, Fondevila M. Fitting of the *in vitro* gas production technique to the study of high concentrate diets. Animals 2020;10(10):1935.
15. Ghaffari S, Gutierrez MF, Seidel-Morgenstern A, Lorenz H, Schulze P. Sodium hydroxide-based CO<sub>2</sub> direct air capture for soda ash production-fundamentals for process engineering. Ind Eng Chem Res 2023;62(19):7566-7579.
16. McCullough H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. Clin Chim Acta 1967;17(2):297-304.
17. Sánchez-Santillán P, Meneses-Mayo M, Miranda-Romero L, Santellano-Estrada E, Alarcón-Zúñiga B. Fribrinolytic activity and gas production by *Pleurotus ostreatus*-IE8 and *Fomes fomentarius* - EUM1 in bagasse cane. Rev MVZ Córdoba 2015;4907-4916.
18. Lavrenčič A, Stefanon B, Susmel P. An evaluation of the Gompertz model in degradability studies of forage chemical components. Anim Sci 1997;64(3):423-431.
19. SAS Institute Inc. Statistical Analysis System, SAS, User's Guide [Internet]. Cary, NC: SAS Inst. 2011.
20. Honan M, Feng X, Tricarico JM, Kebreab E, Honan M, Feng X, *et al.* Feed additives as a strategic approach to reduce enteric methane production in cattle: modes of action, effectiveness and safety. Anim Prod Sci 2022;62:1303-1317.
21. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J Dairy Sci 2007;90(6):2580-2595.

22. Nutrient requirements of dairy cattle. National Academies of Sciences. Eighth Rev Ed. <https://nap.nationalacademies.org/catalog/25806/nutrient-requirements-of-dairy-cattle-eighth-revised-edition>.
23. Polin LAR, Muro AR, Díaz LHG. Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu 2014;5(1):25-48.
24. Castillo-Lopez E, Domínguez-Ordóñez MG. Factors affecting the ruminal microbial composition and methods to determine microbial protein yield. Review. Rev Mex Cienc Pecu 2019;10(1):120-48.
25. Benetel G, Silva T dos S, Fagundes GM, Welter KC, Melo FA, Lobo AAG, *et al.* Essential oils as *in vitro* ruminal fermentation manipulators to mitigate methane emission by beef cattle grazing tropical grasses. *Molecules* 2022;27(7):2227.
26. Zhang H, An D, Cao Y, Tian Y, He J. Modeling the methane production kinetics of anaerobic co-digestion of agricultural wastes using sigmoidal functions. *Energies* 2021;14(2):258.
27. He Y, Wang H, Yu Z, Niu W, Qiu Q, Su H, *et al.* Effects of the gender differences in cattle rumen fermentation on anaerobic fermentation of wheat straw. *J Clean Prod* 2018;205:845-853.
28. Xu H, Li Y, Hua D, Mu H, Zhao Y, Chen G. Methane production from the anaerobic digestion of substrates from corn stover: Differences between the stem bark, stem pith, and leaves. *Sci Total Environ* 2019;694:133641.
29. Pečar D, Pohleven F, Goršek A. Kinetics of methane production during anaerobic fermentation of chicken manure with sawdust and fungi pre-treated wheat straw. *Waste Management* 2020;102:170-178.