

Degradación ruminal y producción de metano en rumiantes alimentados con forraje y aceite de semilla de calabaza (*Curcubita moschata*)

Ruminal degradation and methane production in ruminants fed forage and pumpkin seed oil (*Curcubita moschata*)

René Pinto-Ruiz¹ , Roselía Ramírez-Díaz^{1*} , David Hernández-Sánchez² , Manuel La O-Arias¹ , José Apolonio Venegas-Venegas¹ 

¹Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agronómicas. Villaflores, Chiapas, México.

²Programa de Ganadería, Colegio de Posgraduados. Montecillo, estado de México, México.

*Autor para correspondencia: roselia.ramirez@unach.mx

RESUMEN

El uso de aceites vegetales es una opción para reducir la producción de metano en la fermentación ruminal. En el presente trabajo se evaluó el efecto del aceite de semilla de calabaza (ASC) sobre la producción de CH₄, cinética de fermentación ruminal y degradación de la materia seca, integrado a dietas de rumiantes utilizando la técnica de producción de gas *in vitro*. Los tratamientos evaluados fueron seis adicionando diferentes niveles de ASC a una dieta base que consistía en *Cynodon nlemfuensis*: T1= 0 % ASC+ 100 % *C. nlemfuensis*; T2= 2 % ASC + 98 % *C. nlemfuensis*; T3= 3 % ASC + 97 % *C. nlemfuensis*; T4= 4 % ASC + 96 % *C. nlemfuensis*; T5= 5 % ASC + 95 % *C. nlemfuensis*; T6= 7 % ASC + 93 % *C. nlemfuensis*, se utilizaron 10 repeticiones para cada tratamiento analizados bajo un diseño completamente al azar y se evaluaron las medias a través de la prueba de Tukey ($P < 0,05$) empleando para todo ello al paquete estadístico SAS. El contenido de ácidos grasos insaturados del ASC fue de 67,2 %, siendo los más abundantes el ácido linoleico y oleico (46,16 y 20,10 %, respectivamente). Respecto a los resultados en la producción de metano (CH₄), el ASC no produjo cambios significativos cuando este fue incorporado a las dietas, sin embargo, se mejoraron las fracciones de fermentación media y se redujeron las fracciones de fermentación lenta. Por otro lado, al utilizar ASC al elevar las proporciones al 4 % afectó disminuyendo la degradación de la materia seca (DGRMS) afectando la degradación de la fibra. De acuerdo a lo obtenido se observó inconsistencia y variabilidad en los resultados por lo que no se sugiere la implementación del ASC como estrategia de mitigación de CH₄ por los efectos negativos provocados DGRMS, a pesar de cumplir con las características que otros aceites han presentado y se sugiere profundizar los aspectos químicos del ASC.

Palabras clave: Calabaza; ácidos grasos insaturados; cinética de fermentación; fracciones de fermentación; metano

SUMMARY

The use of vegetable oils is an option to reduce methane production in ruminal fermentation. In the present work, the effect of pumpkin seed oil (CSA) on CH₄ production, rumen fermentation kinetics and dry matter degradation was evaluated, integrated into ruminant diets using the *in vitro* gas production technique. The treatments evaluated were six adding different levels of ASC to a base diet that consisted of *Cynodon nlemfuensis*: T1= 0 % ASC+ 100 % *C. nlemfuensis*; T2= 2 % ASC + 98 % *C. nlemfuensis*; T3= 3 % ASC + 97 % *C. nlemfuensis*; T4= 4 % ASC + 96 % *C. nlemfuensis*; T5= 5 % ASC + 95 % *C. nlemfuensis*; T6= 7 % ASC + 93 % *C. nlemfuensis*, 10 repetitions were used for each treatment analyzed under a completely randomized design and the means were evaluated through the Tukey test ($P < 0.05$) using the statistical package for all of this. SAS. The unsaturated fatty acid content of the BSA was 67.2%, with the most abundant being linoleic and oleic acids (46.16 and 20.10% respectively). Regarding the results in methane (CH₄) production, the ASC did not produce significant changes when it was incorporated into the diets, however, the medium fermentation fractions were improved and the slow fermentation fractions were reduced. On the other hand, when using ASC, raising the proportions to 4% affected by the degradation of dry matter (DGRMS), affecting the degradation of the fiber. According to what was obtained, inconsistency and variability was observed in the results, so the implementation of ASC as a CH₄ mitigation strategy is not suggested due to the negative effects caused by DGRMS, despite meeting the characteristics that other oils have presented and are suggests deepening the chemical aspects of ASC.

Key words: Pumpkin; unsaturated fatty acids; fermentation kinetics; fermentation fractions; methane

INTRODUCCIÓN

El sector pecuario se ha considerado una de las actividades más influyentes en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI). La producción de metano se origina durante el proceso de fermentación ruminal de los alimentos consumidos por rumiantes y la cantidad que se emite está relacionado con la calidad nutritiva y la composición de la dieta proporcionada [1].

La emisión de GEI es una problemática en crecimiento, por lo que han surgido investigaciones asociadas a la mitigación de estos gases adoptando diversas estrategias, tales como mejorar la calidad nutritiva de las dietas [2], el uso de vacunas y antibióticos [3], el mejoramiento genético [4] entre otras. De las anteriores, mejorar la calidad nutritiva de las dietas es una de las propuestas con mayor potencial y viabilidad. Al respecto, existen estudios que han incorporado aceites vegetales con ácidos grasos insaturados o poliinsaturados en la dieta de los rumiantes, que afectan la formación de metano (CH₄) [5, 6]. La acción que ejercen este tipo de ácidos es, por un lado, suprimir a las bacterias metanogénicas y aprovechar el hidrógeno para de esa forma evitar la formación de CH₄, y, por otro lado, la defaunación del ambiente ruminal [7]. En este sentido, se afirma que los ácidos grasos con mayor contenido de ácido linoleico y linolénico han demostrado mayor efectividad [8].

En relación con lo anterior, el aceite de semilla de calabaza (ASC) está constituido por ácidos grasos poliinsaturados cuyo rango va de 40 a 90 % [9], con alto contenido de ácido linoleico y linolénico [10], lo que lo convierte en un recurso local que podría utilizarse como un participante activo en la disminución de la producción de CH₄ en rumiantes, sin embargo, no existen estudios que evalúen este efecto.

Para la estimación de la producción de CH₄ en el rumen, se han utilizado diversas técnicas, algunas más complejas que otras. Entre ellas, se ha utilizado la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG *in vitro*), que además de evaluar el impacto de las dietas en los rumiantes durante el proceso de fermentación, recientemente se ha utilizado para estimar la producción de CH₄, obteniendo resultados convincentes [11]. Por lo tanto, ante la problemática antes mencionada y considerando el alto valor nutricional del ASC, en este trabajo, se evaluó la incorporación del aceite de la semilla de calabaza en la dieta de pequeños rumiantes y su efecto en la reducción de CH₄ y en los parámetros de fermentación ruminal utilizando la técnica de gas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Campus V, de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado en Villaflores, Chiapas, localizado entre los paralelos 16°14'1" N y 93°16'0" O, con un clima cálido subhúmedo, con lluvias en verano, correspondiendo al clima tipo Aw, una precipitación de 1100 mm anuales y una temperatura media anual de 25°C [12].

Obtención de la semilla de calabaza y preparación del sustrato

La semilla de calabaza (*Curcubita moschata*) (SC) se adquirió en localidades de la zona centro de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, considerada como una de los cultivos agrícolas más cultivados de la región.

Extracción y análisis del perfil de aceite de semilla de calabaza

La extracción del aceite de la SC se realizó a través del método Soxhlet (Difite®, modelo D2405-50, México) utilizando hexano como disolvente [13]. El perfil de ácidos grasos se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas empleando una columna DB-waxter de 60 m × 250 mm × 0,25 μm (Agilent Modelo 7890 B GC, Wilmington, EE. UU). Las muestras de aceite se esterificaron previamente y se inyectó 1 μL al cromatógrafo para su análisis [14].

Obtención de inóculo ruminal

El líquido ruminal se obtuvo de tres ovinos (*Ovis aries*) de la raza Katahdin el cual fue utilizado para incubar las muestras en las pruebas *in vitro*. Los animales fueron alimentados con una dieta con 6,5 % de PC y 2,0 Mcal·kg⁻¹·MS⁻¹, formulada de acuerdo a los requerimientos diarios que determina el National Research Council [15]. Cabe señalar que los animales tuvieron el trato adecuado de acuerdo a los protocolos establecidos por la Ley Federal de Sanidad Animal Vigente NOM-062-ZOO-1999 y bajo las normas de bienestar animal establecidas por la Facultad Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas.

Tratamientos evaluados

Se evaluaron seis (6) tratamientos que consistieron en diferentes proporciones de ASC y pasto *Cynodon nlemfuensis* (TABLA I). El porcentaje de inclusión se consideró con base a los porcentajes adecuados para mantener las condiciones óptimas de la fermentación ruminal, ya que, según investigaciones previas, la inclusión de lípidos mayores al 7 % reduce la digestibilidad de la fibra y la ingesta del alimento [16].

TABLA I
Dieta base con niveles crecientes de aceites de semilla de calabaza (*Curcubita moschata*)

Ingrediente %	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Pasto <i>Cynodon nlemfuensis</i>	100	98	97	96	95	93
Aceite de semilla de calabaza	0	2	3	4	5	7

Variables evaluadas

• Estimación de la cinética y fracciones de fermentación

Para conocer los parámetros de la cinética de fermentación, se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* [17]. Se colocaron 0,5 g de cada uno de los tratamientos evaluados en frascos de vidrio color ámbar de 125 mL de capacidad. Posteriormente, bajo un flujo continuo de bióxido de carbono (CO₂), a cada frasco se le agregaron 90 mL de inóculo ruminal diluido (1:10). La solución mineral reducida estuvo compuesta de KH₂PO₄ (0,45 g·L⁻¹), NaCO₃ (0,6 g·L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (0,45 g·L⁻¹), NaCl (0,9 g·L⁻¹), MnSO₄ (0,18 g·L⁻¹), CaCl₂ (0,12 g·L⁻¹), L-cisteína (0,25 g·L⁻¹) y Na₂S (0,25 g·L⁻¹) (Meyer, Ciudad de México, México). Una vez llenos los frascos se sellaron herméticamente con tapón de goma y aro de aluminio, para posteriormente ser incubados en un baño maría analógico a 39°C (Prendo®, modelo BM-20; Ciudad de México, México), se incluyeron seis blancos (sin sustrato).

Para conocer los parámetros de fermentación, la presión de gas se midió con un manómetro (Infra; modelo 63100/1-4; México) a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68 y 72 horas (h) de incubación. Los valores de presión ($\text{kg}^{-1}\cdot\text{cm}^2$) se convirtieron para volumen de gas ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ de sustrato) con una ecuación de regresión (volumen = presión/0,019 con $R^2 = 0,98$). Los parámetros de la cinética de producción de gas; volumen máximo ($V_{\text{máx}}$), tasa (S) y fase de retardo (L) se estimaron con el modelo logístico $V=V_{\text{m}}/1+e^{-(2-4)^S(T-L)}$ [18].

Se estimaron las fracciones de fermentación a través del volumen fraccional (V_f) de gas de fermentación a intervalos de tiempo de 0 a 8 (V_{f0-8}), 8 a 24 (V_{f8-24}) y 24 a 48 (V_{f24-48}) h de incubación, por lo que, fueron transformados a fracciones ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de MS) de rápida (FR), media (FM) y lenta (FL) fermentación utilizando las ecuaciones de regresión; FR ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) = $V_{f0-8}/0,4266$ ($R^2 = 0,9441$), FM ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) = $V_{f8-24}/0,6152$ ($R^2 = 0,998$) y FL ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) = $V_{f24-48}/0,3453$ ($R^2=0,9653$) [19].

• Estimación de la producción de metano y degradación de la materia seca

Para determinar CH_4 y CO_2 , se realizó una segunda serie de fermentación y utilizó una jeringa de vidrio (B-D Yale™) de 50 mL para hacer las lecturas de la producción de gas a las 6, 12, 18 y 24 h de incubación. El total de la producción de gas de fermentación se determinó sumando el volumen de gases producidos en cada medición. Se estimó el metano más gases menores (CH_4+GM). Para ello, al gas de fermentación se le realizó la separación del CO_2 por medio de una trampa (frasco de vidrio herméticamente sellado con tapón de hule y aro de aluminio) que contenía 40 mL de hidróxido de potasio (KOH) a una concentración de uno molar y una dilución de 56,10 g de KOH en un litro de agua destilada [20]. El volumen residual fue considerado como mL de CH_4+GM y fueron ajustados como metano teórico (CH_4) multiplicando cada valor por 0,7714. Estos valores se utilizaron para estimar el volumen total de gas de fermentación (VTGF; $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ MS) y la proporción (%) de CH_4 y, por diferencia, se obtuvo el porcentaje de CO_2 [21].

Al finalizar el periodo de incubación (24 h), se determinó la degradación de la materia seca (DGRMS_{24h}), para ello, el residuo de cada frasco se filtró a través de papel de filtro previamente pesado. Los papeles con residuo se secaron a 65°C por 48 h, se pesaron y se restó el peso del papel filtro inicial. Finalmente, la DGRMS_{24h} se calculó por diferencia entre el peso de la materia inicial, antes de ser incubada, y el peso de la materia residual después del periodo de incubación.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los resultados obtenidos en cada experimento se sometieron a un análisis de varianza mediante el procedimiento GLM en el paquete estadístico SAS [22], versión 9.0, utilizando un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos y 10 repeticiones. Las medias fueron comparadas a través de la prueba de Tukey ($P<0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Perfil de los ácidos grasos del aceite de semilla de calabaza

El perfil de los ácidos grasos del ASC (TABLA II) muestra mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados (46,4%), principalmente por el alto contenido de ácido linoleico (46,16%), lo que corresponde casi a la mitad de los ácidos grasos que contiene la semilla de calabaza.

TABLA II
Ácidos grasos del aceite de semilla de calabaza (*Curcubita moschata*)

	Ácidos grasos		
	Saturados (%)	Monoinsaturados (%)	Poliinsaturados (%)
Aceite de semilla de calabaza	32,12	21,04	46,4

Con respecto a los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, estos fueron de menor concentración (32,12 y 21,04%, respectivamente). Con respecto al perfil de los ácidos grasos del ASC se encontró la siguiente abundancia (%), láurico 0,02; pentadecílico 0,02; palmítico 20,76; palmitoleico 0,20; margárico 0,11; esteárico 10,44; oleico 20,10, vaccénico 0,72; linoleico 46,16; linoléico 0,27; araquídico 0,58; nódécilico 0,16. Del total de ácidos grasos, el valor más alto lo presentó el ácido linoleico con un valor de 46,16%, seguido de los ácidos palmítico y oleico (20,8 y 20,1%) respectivamente.

Lo anterior, indica que el ASC tiene potencial para disminuir la producción de CH_4 entérico, principalmente por su alta composición de ácidos grasos poliinsaturados, ello, debido a la toxicidad que ejercen los ácidos grasos de cadena larga y media sobre las bacterias metanógenas [23], y por el consumo de hidrógenos disponibles en el proceso de biohidrogenación cuando el aceite es incorporado a una dieta [24].

Variables de fermentación ruminal evaluadas con aceite de semilla de calabaza

• Cinética de fermentación y degradación

Con relación a los resultados de la cinética de fermentación (TABLA III), no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para $V_{\text{máx}}$ ($P>0,05$), pero si para la tasa de fermentación (S, h^{-1}) y fase de retardo (L, h). Se observa que a partir del T4, T5 y T6 se fermentan más rápidamente ($P<0,05$), lo que representa una mayor adaptación microbiana en un menor tiempo en comparación a los otros tratamientos (T1, T2 y T3). En cuanto a S se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($P<0,05$), siendo T1, el de menor tasa de producción de gas (0,029 h^{-1}), lo que indica que la inclusión del aceite aumentó la velocidad de fermentación del sustrato.

TABLA III
Cinética de fermentación y degradación de la materia seca de dietas compuestas por aceite de semilla de calabaza y *Cynodon nlemfuensis*

Tratamiento	$V_{\text{máx}}$ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	S (h^{-1})	L (h)	DGRMS
T1 (100%)	408,98 ^a	0,029 ^d	8,72 ^{ab}	49,11 ^a
T2 (98:2%)	412,17 ^a	0,033 ^{ab}	9,00 ^a	50,51 ^a
T3 (97:3%)	400,84 ^a	0,032 ^c	8,39 ^{abc}	50,91 ^a
T4 (96:4%)	404,17 ^a	0,032 ^{bc}	7,93 ^c	49,34 ^a
T5 (95:5%)	414,37 ^a	0,033 ^{ab}	7,71 ^c	41,45 ^b
T6 (93:7%)	397,97 ^a	0,034 ^a	8,14 ^{bc}	35,48 ^b

^{a, b, c}: Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, $P<0,05$). $V_{\text{máx}}$: Volumen máximo; S: Tasa de producción de gas; L: Fase de retardo; DGRMS: Degradación de la materia seca a 24 h.

Por otro lado, se observó que al aumentar los niveles al 5 y 7 % de ASC, la DGRMS disminuye significativamente ($P < 0,05$) (TABLA III), lo anterior podría atribuirse a que la inclusión de lípidos mayor al 6-7 % reduce la digestibilidad de la fibra [16]. Los resultados tuvieron la misma tendencia con los reportados por Orozco-Durán et al. [25], quienes utilizaron *C. plectostachyus* como forraje base con diferentes proporciones de aceite de semilla de *Thevetia peruviana* (TP) y fruto de *Persea americana* (AG). Dichos autores reportan que el tratamiento testigo (pasto; 0 % de aceite) presentó, en promedio 67,2 % de DGRMS, sin embargo, cuando se incorporó 6 % de los aceites se observó una reducción en la degradación de hasta un 11 %, concluyendo que al incorporar niveles de 4 y 6 % de aceite genera un impacto directo sobre la fermentación y la degradación del forraje, mientras que en el presente trabajo, se observó que el T1 (0 % de aceite) presentó el 49,11 % de DGRMS y al incorporar el 5 y 7 % de aceite disminuyeron a 41,45 y 35,585 %, respectivamente. Por su parte, García et al. [26] observaron que al utilizar dosis crecientes aceite esencial de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* tuvieron una acción progresivamente inhibitoria en la digestibilidad de diferentes dietas, con una inhibición casi total cuando se utilizaron 300 $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$. Lo que también coincide con Samal et al. [24] quienes mencionan que incorporar aceites esenciales a la alimentación de rumiantes incluso puede afectar el consumo de materia seca de los alimentos.

• Fracciones de fermentación

La inclusión de ASC no modificó ($P > 0,05$) las fracciones de FR de los tratamientos (TABLA IV) a excepción del T2 que presentó menor valor que fue de 77,43 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ a las 8 h de incubación, sin embargo, no se observaron diferencias significativas de relevancia, esto, indica que el aceite no aumentó las fracciones de FR (azúcares). Con respecto a las fracciones de FM los tratamientos donde fueron estadísticamente más altas ($P < 0,05$) fueron T2, T5 y T6, por el contrario, el T1 con 0 % de aceite fue el de menor FM. Por otro lado, los valores más altos estadísticamente ($P < 0,05$) en FL fue el T1 y T2, por lo que se observó que a partir de la inclusión del 3 % de aceite (T3) disminuyó la fracción de FL, por lo que, la inclusión de aceite no influyó en las fracciones de FR, sin embargo, aumenta las de FM y reduce las de FL.

• Producción de metano

La inclusión de ASC no presentó diferencias significativas de relevancia ($P > 0,05$) y se observaron resultados inconsistentes en la producción de CH_4 (TABLA V), sin embargo, es de destacar que

TABLA IV
Fracciones de fermentación de dietas compuestas por aceite de semilla de calabaza y *Cynodon nlemfuensis*

Tratamiento	FR ₀₋₈ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	FM ₈₋₂₄ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	FL ₂₄₋₄₈ ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	FT ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)
T1 (100 %)	91,884 ^{ab}	246,880 ^d	526,077 ^a	864,84 ^a
T2 (98:2 %)	77,430 ^b	297,233 ^{ab}	498,204 ^{ab}	872,87 ^a
T3 (97:3 %)	90,827 ^{ab}	275,479 ^c	482,527 ^{bc}	848,83 ^a
T4 (96:4 %)	94,703 ^a	293,566 ^{bc}	465,109 ^{cd}	853,38 ^a
T5 (95:5 %)	96,113 ^a	312,387 ^a	462,929 ^{cd}	871,43 ^a
T6 (93:7 %)	84,480 ^{ab}	304,566 ^{ab}	449,866 ^d	838,91 ^a

^{a, b, c, d}: Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, $P < 0,05$) FR: Fermentación rápida 0-8 h; FM: Fermentación media 8-24 h; FL: Fermentación lenta 24-48 h; FT: Fermentación total

TABLA V
Producción de metano en dietas compuestas por Aceite de Semilla de Calabaza y *Cynodon nlemfuensis*

Tratamiento	VT ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	CO_2 (%)	CH_4 (%)	CH_4 ajustado ($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)	pH
T1 (100 %)	146,42 ^b	82,93 ^{ab}	13,17 ^{ab}	18,82 ^{ab}	6,91 ^b
T2 (98:2 %)	150,85 ^{ab}	79,23 ^b	16,01 ^a	23,23 ^a	6,91 ^b
T3 (97:3 %)	156,28 ^a	80,82 ^{ab}	13,81 ^{ab}	19,99 ^{ab}	6,92 ^{ab}
T4 (96:4 %)	147,00 ^{ab}	84,57 ^a	13,07 ^{ab}	19,32 ^{ab}	6,91 ^b
T5 (95:5 %)	152,28 ^{ab}	84,46 ^a	11,98 ^b	16,48 ^b	6,95 ^a
T6 (93:7 %)	151,28 ^{ab}	84,78 ^a	11,20 ^b	16,97 ^b	6,93 ^{ab}

^{a, b}: Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, $P < 0,05$). VT: Volumen total; CO_2 (%): Porcentaje de dióxido de carbono; CH_4 (%): Porcentaje de metano; CH_4 ajustado: Metano ajustado; pH: potencial de hidrógeno

el VT de gas producido en 24 h en el T1 fue de 146,42 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ de los cuales, 13,17 % fue CH_4 (18,82 $\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$ MS), sin presentar diferencias significativas con los T5 y T6, tratamientos con mayor porcentaje de aceite (5 y 7 %, respectivamente).

La inclusión de aceite no modificó la producción de CH_4 a nivel ruminal, por ello, una de las razones probablemente sea los niveles altos de pH que se observó en el presente trabajo, las cuales, fueron mayores a 6,9; condición que no afecta a las bacterias metanogénicas [28] y por consiguiente no reduce la producción de CH_4 . En este sentido, no se encontró un resultado lineal conforme se incrementó el porcentaje de aceite en la dieta, y de acuerdo con Orozco-Durán et al. [25] en algunos casos existe variabilidad de resultados por el tipo de forraje utilizado y la calidad del mismo, así también, influye el tipo de aceite, el perfil de ácidos grasos y la metodología de extracción utilizada, por lo que resulta difícil establecer parámetros óptimos o de referencia sobre la inclusión de aceite, lo que coincide con Kholif et al. [29] quienes mencionan que una de las principales limitaciones de los aceites esenciales es la dificultad de definir dosis óptimas, lo que origina resultados inconsistentes y no concluyentes.

En este mismo sentido, la no disminución de la producción de CH_4 se puede atribuir al proceso de biohidrogenación que sufren los ácidos grasos poliinsaturados a nivel ruminal, ya que este tipo de ácidos grasos pueden inhibir a los metanógenos por la toxicidad directa que ejercen sobre ellas [30], ya que probablemente los iones hidrógeno que se producen durante este proceso saturan a los ácidos grasos poliinsaturados haciéndolos menos tóxicos para las bacterias metanogénicas [31], y en consecuencia no afecta a la formación de CH_4 .

Por otro lado, Avato y Tava [31] señalan que los aceites vegetales pueden variar en estructuras químicas y estereoquímicas y por ende en sus actividades bioactivas de acuerdo a la especie, y a pesar de que la adición de grasas o aceites en las dietas sea una de las opciones más reconocidas para reducir CH_4 ruminal, no siempre se ha obtenido un resultado consistente y definitivo [29], lo que ha impedido establecer un nivel óptimo de su uso en la reducción de metano. En ese sentido, considerando la variedad existente en los compuestos químicos en los aceites puede considerarse que la actividad antimicrobiana no sea atribuible a un mecanismo específico sino a una acción combinada de varios factores.

CONCLUSIONES

La inclusión de aceite de semilla de calabaza presentó resultados inconsistentes y no redujo la producción de metano, y al aumentar sus concentraciones se afectó la degradación de la materia seca, sin embargo, aumentaron las concentraciones de carbohidratos de media fermentación y se redujeron las fracciones de fermentación lenta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen extensamente a las autoridades del Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del estado de Chiapas, México, por los apoyos brindados, para llevar a cabo este trabajo, en la convocatoria Apoyos a la Investigación 2023.

Conflicto de Interés

Los autores declaran la no existencia de conflictos en el presente trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Abdalla AL, Alvarez C, Arndt C, Becquet P, Benchaar C, Berndt A, Mauricio RM, McAllister T, Oyhantçabal W, Salami SA, Shalloo L, Sun Y, Tricarico J, Uwizeye A, De Camillis C, Bernoux M, Robinson T, Kebreab E. Invited review: Current enteric methane mitigation options. *J. Dairy Sci.* [Internet]. 2022; 105(12):9297–9326. doi: <https://doi.org/gsm8m7>
- [2] Gaviria-Urbe X, Bolivar DM, Rosenstock TS, Molina-Botero IC, Chirinda N, Barahona R, Arango J. Nutritional quality, voluntary intake and enteric methane emissions of diets based on novel cayman grass and its associations with two leucaena shrub legumes. *Front. Vet. Sci.* [Internet]. 2020 7:579189. doi: <https://doi.org/gmtwtz>
- [3] Króliczewska B, Pecka-Kiełb E, Bujok J. Strategies used to reduce methane emissions from ruminants: controversies and issues. *Agriculture* [Internet]. 2023; 13(3):602. doi: <https://doi.org/g8s35g>
- [4] Kamalanathan S, Houlahan K, Miglior F, Chud TCS, Seymour DJ, Hailemariam D, Plastow G, De Oliveira HR, Baes CF, Schenkel F. Genetic analysis of methane emission traits in holstein dairy cattle. *Animals* [Internet]. 2023; 13(8):1308. doi: <https://doi.org/g8s35h>
- [5] Yang Z, Liu S, Xie T, Wang Q, Wang Z, Yang H, Li S, Wang W. Effect of unsaturated fatty acid ratio In vitro on rumen fermentation, methane concentration, and microbial profile. *Fermentation* [Internet]. 2022; 8(10):540. doi: <https://doi.org/nvj3>
- [6] Castañeda-Rodríguez CS, Pámanes-Carrasco GA, Páez-Lerma JB, Herrera-Torres E, Araiza-Rosales EE, Hernández-Vargas V, Medrano-Roldán H, Reyes-Jáquez D. Effect of vegetable oils or glycerol on the in vitro ruminal production of greenhouse gases. *Ruminants* [Internet]. 2023; 3(2):140–148. doi: <https://doi.org/g8s35j>
- [7] Kargar S, Taasoli G, Akhlaghi A, Zamiri MJ. In vitro rumen fermentation pattern: insights from concentrate level and plant oil supplement. *Arch. Anim. Breed.* [Internet]. 2023; 466(1):1–8. doi: <https://doi.org/g8s35k>
- [8] Broucek J. Options to methane production abatement in ruminants: A review. *J. Anim. Plant Sci.* [Internet]. 2018 [consultado 25 May. 2024]; 28(2):348–364. Disponible en: <https://goo.su/msc4>
- [9] Bouazzaoui N, Mulengi JK. Fatty acids and mineral composition of melon (*Cucumis Melo*) and pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds. *J. Herbs Spices Med. Plants* [Internet]. 2018; 24(4):315–322. doi: <https://doi.org/g8s35m>
- [10] Rössel-Kipping D, Ortiz-Laurel H, Amante-Orozco A, Durán-García HM, López-Martínez LA. Características físicas y químicas de la semilla de calabaza para mecanización y procesamiento. *Nova Scientia* [Internet]. 2018; 10(21):61–77. doi: <https://doi.org/g8s35n>
- [11] Ramírez-Díaz R, Pinto-Ruiz R, Miranda-Romero LA, La O-Arias MA, Hernández-Sánchez D, Raj-Aryal D. Predicción de metano de dos frutos arbóreos por cromatografía de gases y gas In vitro. *Ecosist. Recur. Agropec.* [Internet]. 2023; 10(3):e3602. doi: <https://doi.org/g8s35p>
- [12] García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 5a ed. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía; 2004. p.79–86.
- [13] AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg(MD, USA): AOAC International; 2005. 1015 p.
- [14] Oteri M, Bartolomeo G, Rigano F, Aspromonte J, Trovato E, Purcaro G, Dugo P, Mondello L, Beccaria M. Comprehensive chemical characterization of Chia (*Salvia hispanica* L.) seed oil with a focus on minor lipid components. *Foods* [Internet]. 2023; 12(1):23. doi: <https://doi.org/g8s35q>
- [15] National Research Council (NRC). Energy. In: Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. Washington, DC: The National Academies Press. 2007; p. 39–80.
- [16] Kumar S, Choudhury PK, Carro MD, Griffith GW, Dagar SS, Puniya M, Calabro S, Ravella SR, Dhewa T, Upadhyay RC, Sirohi SK, Kundu SS, Wanapat M, Puniya AK. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [Internet]. 2014; 98(1):31–44. doi: <https://doi.org/f5msgr>
- [17] Menke K, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 1988; 28:7–55.
- [18] Schofield P, Pell AN. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.* [Internet]. 1995; 73(11):3455–3463. doi: <https://doi.org/g8s35r>
- [19] Miranda-Romero LA, Sandoval-González L, Amendola-Massiotti R. Producción de gas como método para estimar in vitro la concentración de carbohidratos fermentables en rumen. *ALPA* [Internet]. 2015; 23(Suppl. 1):145. Disponible en: <https://goo.su/aUGMUEI>
- [20] Bartha R, Pramer D. Features of flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Sci.* [Internet]. 1965 [consultado 21 Ene. 2024]; 100(1):68–70. Disponible en: <https://goo.su/sZbzMH>
- [21] Zhong RZ, Fang Y, Sun HX, Wang M, Zhou DW. Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an in vitro gas production technique. *J. Integr. Agric* [Internet]. 2016; 15(2):414–423. doi: <https://doi.org/g8s35s>

- [22] SAS Institute Inc. 2002. SAS/STAT Ver. 6.2.9200. User's Guide. Cary, NC (USA): SAS Institute Inc.
- [23] Torres RNS, Moura DC, Ghedini CP, Ezequiel JMB, Almeida MTC. Meta-analysis of the effects of essential oils on ruminal fermentation and performance of sheep. *Small Rumin. Res.* [Internet]. 2020; 189:106148. doi: <https://doi.org/g8s35t>
- [24] Samal L, Dash SK. Nutritional interventions to reduce methane emissions in ruminants. In: Kumar Patra A, editor. *Animal Feed Science and Nutrition - Production, Health and Environment* [Internet]. Londres: IntechOpen Limited; 2022. 19 p. doi: <https://doi.org/g8s35v>
- [25] Orozco-Durán KE, Herrera-Camacho J, Castelán-Ortega OA, Márquez-Benavides L, Buenrostro-Delgado O, Kú-Vera JC. Reducción de la metanogénesis ruminal in vitro con aceites vegetales de *Thevetia peruviana* y *Persea americana*. *Ecosist. Recur. Agropec.* [Internet]. 2016 [consultado 10 Ene. 2024]; 3(9):335-344. Disponible en: <https://goo.su/LyNuMzP>
- [26] Garcia F, Colombatto D, Brunetti M, Martínez JM, Moreno VM, Scorcione Turcato M, Lucini E, Frossasco G, Martínez Ferrer J. The reduction of methane production in the in vitro ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. *Animals* [Internet]. 2020; 10(5):786. doi: <https://doi.org/g8s35w>
- [27] Fouts JQ, Honan MC, Roque BM, Tricarico JM, Kebreab E. Enteric methane mitigation interventions. *Transl. Anim. Sci.* [Internet]. 2022; 6(2):1-16. doi: <https://doi.org/g8s35x>
- [28] Kholif AE, Olafadehan OA. Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochem. Rev.* [Internet]. 2021; 20(6):1087-1108. doi: <https://doi.org/g8s35z>
- [29] Méndez-Rodríguez L. Optimización de la digestión anaerobia de microorganismos fotosintéticos: pretratamiento térmico y uso de cianobacterias [tesis doctoral en Internet]. España: Universidad Complutense de Madrid; 2018. [consultado 10 Ene. 2024]. 271 p. Disponible en: <https://goo.su/1IQVrk0>
- [30] Elsamadony M, Mostafa A, Fujii M, Tawfik A, Pant D. Advances towards understanding long chain fatty acids-induced inhibition and overcoming strategies for efficient anaerobic digestion process. *Water Res.* [Internet]. 2021; 190:116732. doi: <https://doi.org/gnmqf7>
- [31] Avato P, Tava A. Rare fatty acids and lipids in plant oilseeds: occurrence and bioactivity. *Phytochem. Rev.* [Internet]. 2021; 21:401-428. doi: <https://doi.org/g5zsp>