

**MONOGRAFIA: EFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITES ESENCIALES SOBRE  
EL CONSUMO DE MATERIA SECA, DIGESTIBILIDAD Y PARÁMETROS DE  
CINÉTICA Y FERMENTACIÓN RUMINAL EN BOVINOS**

GERMÁN DE JESÚS ROJAS MERCADO

CÓDIGO: 150210147

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
FUSAGASUGÁ

2017

**MONOGRAFIA: EFECTO DE LA ADICIÓN DE ACEITES ESENCIALES SOBRE  
EL CONSUMO DE MATERIA SECA, DIGESTIBILIDAD Y PARÁMETROS DE  
CINÉTICA Y FERMENTACIÓN RUMINAL EN BOVINOS**

GERMÁN DE JESÚS ROJAS MERCADO

CÓDIGO: 150210147

Propuesta de trabajo de grado opción monografía como requisito parcial para la obtención  
del título de Zootecnista

Director

Laura Alexandra Romero Solórzano, Zootecnista, MSc. en Ciencias en Nutrición y  
Producción Animal

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
PROGRAMA DE ZOOTECNIA  
FUSAGASUGÁ

2017

## **DEDICATORIA**

A mis Padres Germán y Norlys por toda su ayuda y motivación en mis estudios, a mi tutora Laura por su ayuda incondicional, a María y a Camila, porque todos son mi familia y por último y no menos importante dedico este documento a todos los soñadores.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutora, la profesora Laura Alexandra Romero Solórzano por su gran ayuda y colaboración en todos los momentos de consulta y soporte de este documento, por despertar en mí el interés de este grandioso y fascinante tema, por su sabiduría y paciencia pero más importante por creer en mí.

Por ultimo a todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente con la creación de este documento les agradezco enormemente sus aportes.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	11
1. OBJETIVOS .....	15
1.1 OBJETIVO GENERAL .....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
2. REVISION DE LITERATURA.....	16
2.1 ACEITES ESENCIALES, GENERALIDADES .....	16
2.1.1 Estructura química .....	17
2.1.2 Modo de acción .....	21
2.2 CONSUMO DE MATERIA SECA .....	23
2.2.1 Efecto de los aceites esenciales sobre el consumo de materia seca .....	24
2.3 DIGESTIBILIDAD.....	25
2.3.1 Efecto de los aceites esenciales sobre la digestibilidad de la materia seca y de nutrientes.....	26
2.4 DEGRADABILIDAD RUMINAL .....	27
2.5 TASA DE PASAJE.....	29
2.6 EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE PARÁMETROS DE CINÉTICA RUMINAL .....	31
2.7 PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE RUMINAL .....	32
2.7.1 Microorganismos responsables de la digestión fermentativa.....	33
2.7.1.1 Bacterias.....	33
2.7.1.2 Protozoarios.....	34
2.7.1.3 Hongos.....	37
2.7.2 Productos de la fermentación ruminal.....	38

2.7.2.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC).....	38
2.7.2.2 Formación de metano entérico y su papel en el ecosistema ruminal. ....	41
2.7.3 Efecto de los aceites esenciales sobre los ácidos grasos de cadena corta .....	43
2.7.4 Efecto de los aceites esenciales sobre el pH ruminal .....	45
2.7.5 Efecto de los aceites esenciales sobre los microorganismos del rumen.....	46
2.7.6 Efecto de los aceites esenciales como estrategia de mitigación de las emisiones de metano .....	47
2.7.7 Efecto de los aceites esenciales sobre el metabolismo proteico.....	50
CONCLUSIONES .....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los aceites esenciales sobre el consumo de materia seca .....	25
Tabla 2. Digestibilidad total de la MS y sus fracciones .....	27
Tabla 3. Efecto de los A.E a dosis de 0, 0,3, 3 y 30 mg / L y pH de 7,0 Y 5,5 sobre la relación acetato-propionato.....	45
Tabla 4. Efecto de los A.E en la producción de gases, principalmente el metano.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Origen de los terpenoides y fenilpropanoides. (Tomado de Avila y Soares, 2007). .....	18
Figura 2. Terpenos – Monoterpenos. Estructura química de los componentes de los aceites esenciales. (Tomado de Bakkali et al., 2007) .....	20
Figura 3. Compuestos aromáticos. Estructura química de los componentes de los aceites esenciales. (Tomado de Bakkali et al., 2007) .....	20
Figura 4. Terpenoides (Isoprenoides). Estructura química de los componentes de los aceites esenciales. (Tomado de Bakkali et al., 2007) .....	21
Figura 5. Modo de acción de los aceites esenciales. (Fuente: propia) .....	22
Figura 6. Incremento del valor biológico de la proteína por acción de los protozoos. (Fuente: propia).....	35
Figura 7. Productos de la fermentación ruminal. (Fuente: propia) .....	41



## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una monografía que abarcó las generalidades y estructura química de los aceites esenciales, así como, el estudio del efecto de la adición de aceites esenciales sobre el consumo de materia seca, digestibilidad, parámetros de cinética y fermentación ruminal y metabolismo proteico en bovinos. En los bovinos la fermentación ruminal está mediada por una serie de parámetros característicos como lo son pH, microorganismos y ácidos grasos de cadena corta, los cuales son intermediarios en la regulación del consumo por parte del animal. Dichos parámetros, varían frecuentemente por las diferentes concentraciones de nutrientes en las dietas de los bovinos y por el tipo de sustrato que llega al rumen, encontrándose cambios que pueden afectar la digestión y desempeño del animal. Los aceites esenciales, presentes en una gran variedad de especies vegetales, tienen un efecto en la modulación de parámetros de fermentación ruminal, así como en la inhibición de los microorganismos metanogénicos, mejorando de esta forma, el metabolismo proteico y aumentando la producción de ácidos grasos de cadena corta, especialmente de ácido propiónico. De igual forma, los aceites esenciales pueden influenciar en gran medida en parámetros digestivos y de cinética ruminal, generando un mejor aprovechamiento de la dieta.

**Palabras clave:** Aceites esenciales, ácidos grasos de cadena corta, tasa de pasaje, degradabilidad.

## ABSTRACT

In the present work a monograph was elaborated that covered the generalities and chemical structure of essential oils, as well as the study of the effect of the addition of essential oils on dry matter intake, digestibility, kinetic parameters and ruminal fermentation and protein metabolism in cattle. In cattle, rumen fermentation is mediated by a series of characteristic parameters such as pH, microorganisms and short-chain fatty acid, which are intermediaries in the regulation of consumption by the animal. These parameters vary frequently by different concentrations of nutrients in the diets of cattle and the type of substrate reaches the rumen, finding changes that may affect digestion and animal performance. Essential oils present in a variety of plant species, have an effect in modulating rumen fermentation parameters as well as the inhibition of methanogenic microorganisms, thereby improving the protein metabolism and increasing production short-chain fatty acid, especially of propionic acid. Similarly, the essential oils can influence heavily on ruminal digestive and kinetic parameters, generating a better use of the diet.

**Keywords:** Essential oils, short-chain fatty acid, passage rate, degradability.

## INTRODUCCIÓN

La actividad ganadera es una de las más importantes a nivel global, pero la tercera con más efectos adversos contaminantes sobre el medio ambiente, ya que constituye una de las principales fuentes de contaminación puntual terrestre (Carmona et al., 2005), por esta razón, es indispensable modificar los productos de la fermentación ruminal, siendo que, para que exista este proceso debe existir una simbiosis entre el ambiente ruminal y los microorganismos que allí se encuentran, resaltando que los parámetros de fermentación ruminal cambian en razón de la alimentación (Burns, 2008). La digestión de los rumiantes es un proceso complejo en el cual existen interacciones entre la dieta y los microorganismos presentes en el contenido ruminal donde se logran resaltar diferentes tasas de degradación y de pasaje de la materia seca, siendo estos parámetros dependientes del tipo de sustrato o la presencia de partículas con altas tasas de degradación como son los carbohidratos solubles o rápidamente fermentables, en comparación a partículas que presentan un menor tiempo de tasa de pasaje y una lenta degradación como lo es el caso de los carbohidratos estructurales presentes en los forrajes. La determinación de parámetros de cinética ruminal, como la tasa de pasaje, tasa de desaparición y de degradación de la materia seca y sus fracciones, es fundamental para el desarrollo de programas eficientes de alimentación en los rumiantes con el fin de mejorar los procesos digestivos y consecuentemente productivos. La restricción de aditivos como los ionóforos, ha hecho que se incentive la producción orgánica eficiente o el uso de fuentes alternativas a los antibióticos con el fin de modificar los procesos de fermentación y cinética ruminal, sin embargo, aditivos en la ración de bovinos que logren un efecto similar al de los ionóforos son escasos. Las investigaciones actuales se han centrado en componentes alternativos en la dieta, como; probióticos, enzimas, aceites esenciales y ácidos orgánicos, en respuesta a la prioridad de la seguridad alimentaria y con el fin evitar el uso de antibióticos en la producción bovina, en este proceso se han estudiado los beneficios de los

aceites esenciales como una alternativa para mitigar las emisiones de metano por parte de animales rumiantes y mejorar los parámetros de fermentación ruminal, entre tanto, la eficiencia de estos varía según su estado de esterificación y tamaño de la cadena (Dilorenzo, 2011). Numerosos han sido los estudios *in-vitro* con este tipo de aceites esenciales, sin embargo, escasos han sido los estudios *in-vivo*, que mencionen el efecto de los aceites esenciales en el metabolismo ruminal.

La inclusión de los aceites esenciales (AE) como moduladores de la cinética y fermentación ruminal en la alimentación de bovinos, reemplaza el efecto antimicrobiano de los antibióticos promotores de crecimiento, por lo tanto, adicionar AE en la ración del rumiante genera un aumento en el rendimiento productivo del animal, viéndose reflejado en un aumento de la digestibilidad de los nutrientes, del metabolismo proteico y ganancia de peso (Greathead, 2003). Además, “los AE modifican la composición del producto final sin el efecto negativo que provocan los antibióticos, ya que estos últimos dejan residuos en el producto final y generan resistencia de las bacterias causantes de patologías humanas” (Page, 2006). De esta forma, se contribuye al incremento del rendimiento productivo implementando los AE como estrategia eficiente para mejorar la calidad y reducir los costos de producción. De igual forma, los AE contribuyen a la degradación de la proteína y el almidón en el rumen, por lo que aumenta la digestibilidad, sin embargo, no afecta la producción de los ácidos grasos de cadena corta, sino que influye directamente sobre las bacterias productoras de amoníaco y los protozoarios disminuyendo significativamente su población en el rumen, lo que incrementa la biodisponibilidad de nutrientes y eficiencia en el aprovechamiento de los mismos (McIntosh et al., 2003).

Dentro de los aceites esenciales utilizados con este propósito se encuentran el aceite de timol y los procedentes de orégano, canela, ajo, rábano, entre otros, los cuales en estudios realizados *in-vitro* han demostrado mejorar la digestibilidad de los nutrientes, alterando la

producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), aumentando la proporción de propionato, generando una mayor eficiencia productiva, sin embargo, los estudios *in-vivo* no han sido concluyentes debido al desconocimiento que aún se tiene sobre el nivel de inclusión adecuado en la dieta (Benchaar et al., 2007a). Su acción similar a los antibióticos aumenta la cantidad de energía disponible de la dieta y esta energía es utilizada en el crecimiento del tejido magro, su ventaja en comparación con los antibióticos es que no contribuye a la selección de bacterias resistentes (Page, 2006).

La Unión Europea prohibió el uso de sustancias ionóforas como aditivos para las dietas en bovinos. Debido a la creciente preocupación de la ciudadanía por sus efectos secundarios en la salud humana, se iniciaron una serie de estudios acerca de los mecanismos de acción de aceites esenciales en el rumen, la mayoría de estudios fueron realizados *in-vitro*, sobre más de 25 extractos vegetales diferentes (incluyendo *Achillea millefolium*, *Arnica chamissonis*, *Betula alba*, *Dactylis glomerata*, *Eucalyptus globulus*, *Ginkgo biloba*, *officinalis ofi Lavandula*, *Lespedeza capitata*, *Hypericum perforatum*, *Solidago virgaurea*, *Fagopyrum esculentum*, *Equisetum arvense*, *Salvia officinalis*, *Pimpinella anisum*, *Juniperus oxycedrus*, *Capsicum annum*, *Cinnamomum cassia*, *Syzygium aromaticum*, *Anethum graveolens*, *Trigonella foenum graecum*, *Allium sativum*, *Zingiber ofi cinale*, *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia* y *Armoracia rusticana*), el origen de estos aceites esenciales anteriormente mencionados son muy comunes en Europa (Sgoifo et al., 2012), entre tanto, en Colombia no existen estudios similares, que indiquen cuales son los aceites esenciales más eficaces a ser utilizados en la dieta de rumiantes y las dosis de inclusión.

Una adaptación de AE en dietas *in-vivo*, daría como resultado información válida que determine su eficiencia real en el rumen. Por lo anteriormente dicho, se torna de gran importancia generar una revisión bibliográfica sobre estudios tanto *in-vivo* como *in-vitro*, que se base en analizar el efecto de la inclusión de ácidos grasos esenciales en la dieta de bovinos

sobre parámetros digestivos, de cinética y fermentación ruminal e inclusive, sobre la modulación en la producción de microorganismos benéficos en el rumen, que contribuyan con el aumento del desempeño animal. El objetivo de la presente monografía es revisar información científica que evidencie la adición de aceites esenciales en dietas para rumiantes y su efecto sobre el consumo de materia seca, la digestibilidad y parámetros de cinética y fermentación ruminal en bovinos.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Realizar una monografía del efecto de la adición de aceites esenciales, sobre el consumo de materia seca, la digestibilidad y parámetros de cinética y fermentación ruminal en bovinos.

### **1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Indicar el efecto de la inclusión de aceites esenciales sobre el consumo de materia seca y la digestibilidad de los nutrientes.
- Revisar acerca del efecto de la adición de aceites esenciales sobre parámetros de cinética ruminal como tasa de pasaje y degradabilidad ruminal.
- Revisar sobre el efecto de la adición de aceites esenciales en la dieta de bovinos sobre parámetros de fermentación ruminal como pH y protozoarios.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 ACEITES ESENCIALES, GENERALIDADES

“Los Aceites esenciales (AE) son compuestos aromáticos volátiles presentes en muchas plantas que se extraen generalmente por vapor y/o destilación de agua. Químicamente los AE son una mezcla de metabolitos secundarios” (Vakili y Khorrami, 2013). Estos componentes, se clasifican de acuerdo a sus múltiples composiciones químicas, naturaleza y propiedades bioactivas. La concentración y tipo de AE en las plantas varía por especie y segmento de la planta, principalmente, sin embargo, también se han reportado diferencias dependientes de la región geográfica y estación de cosecha. Según su principio activo, los AE se clasifican en terpenoides (monoterpenoides y sesquiterpenoides) y fenilpropanoides, estos dos grupos son sintetizados por vías metabólicas diferentes en las plantas y se originan de diferentes precursores del metabolismo primario. Los terpenoides se denominan así porque derivan de una estructura básica de cinco carbonos ( $C_5H_8$ ) se han descrito aproximadamente 15,000, conformando el grupo más diversificado y numeroso, entre ellos, se encuentran limoneno, timol, carvacrol, linalol, carvon, entre otros. Referente a los fenilpropanoides, estos son menos comunes, pero algunas plantas los contienen en cantidades altas, poseen cadenas de tres carbonos ligados a anillos aromáticos de seis carbonos y derivan en su mayoría de la fenilalanina (aminoácido aromático) sintetizada por la vía metabólica la cual es sólo funcional en microorganismos y plantas (Polin et al., 2014).

“La función principal de los AE es brindarle a la planta protección contra agentes estresantes abióticos y bióticos, en algunas ocasiones funciona para atraer a otros organismos y así favorecer la polinización y dispersión de sus semillas” (Polin et al., 2014). “En cuanto a los rumiantes los AE han demostrado efectos favorables en la fermentación ruminal y mejoran la utilización de los nutrientes debido a su actividad antimicrobiana” (Vakili y Khorrami, 2013), “además de ello, tienen un gran potencial para manipular la fermentación



del rumen, inhibiendo la descomposición de las proteínas, lo que aumenta la disponibilidad de estas en el rumen” (McIntosh et al., 2003). Los AE tienen una acción similar a un ionóforo, inhibiendo selectivamente a las bacterias Gram-positivas, afectando el transporte transmembranal de iones en este tipo de microorganismos, influyendo en la producción de AGCC, pero su efectividad depende en gran medida del tipo de dieta (o sustrato de incubación) utilizada, el tipo y dosis de aceite esencial utilizado y la presencia de componentes activos (Dilorenzo, 2011). Los AE de interés deben ser compuestos capaces de seleccionar y estimular la proliferación de la microbiota ruminal, aumentando la cantidad de propionato y reduciendo la producción de acetato y metano, sin alterar la cantidad total de AGCC. Algunos AE tienen impacto en la producción de AGCC y sobre los perfiles de producción de los mismos (Meyer et al., 2009). McIntosh et al. (2003) evaluó *in vitro* el efecto de AE en cultivos puros sobre los microorganismos ruminales, en este estudio, cuando se adicionó una mezcla de AE (timol, eugenol, vainillina y limoneno) al cultivo, se inhibieron algunos microorganismos a menos de 100 ppm; la especie *Streptococcus bovis* fue la más resistente y *Prevotella ruminicola*, *Clostridium sticklandii*, y *anaerobius Peptostreptococcus* fueron las especies más sensibles. Los autores indicaron que en dosis muy elevadas (1,000 ppm), estos A.E son capaces de inhibir el crecimiento de casi todos los microorganismos ruminales.

### **2.1.1 Estructura química**

Los aceites esenciales son una mezcla de sustancias volátiles, son extraídos de plantas aromáticas y se encuentran en todas las partes que las constituyen, ya sea en las hojas y ramas así como también en su corteza, tronco, raíces, frutas, flores, semillas y resinas (Zoghbi et al., 1998). Los A.E se originan del metabolismo secundario vegetal y se encuentran constituidos por diferentes tipos de alcoholes, aldehídos, ésteres de ácidos grasos, cetonas, óxidos, peróxidos, furanos, lactonas, cumarinas, hidrocarburos como los terpenos, terpenoides y

sesquiterpenoides, siendo la clase de los terpenos la más común en la composición química volátil de las plantas (Bajpai et al., 2008; Simões et al., 2003). Estos A.E son mezclas complejas de compuestos orgánicos que al ser producidos como un metabolito secundario se encuentran direccionados a otras necesidades específicas de la planta diferentes a la nutrición, creando estas sustancias de defensa para su protección ante depredadores naturales (Harrewijn et al., 2001). “Entre los compuestos más comunes se pueden evidenciar los monoterpenos y sesquiterpenos cuya principal ruta metabólica es a través de mevalonato que conduce a sesquiterpenos y el metileritritol es precursor de los monoterpenos” (Baser y Buchbauer, 2010).

La mayoría de los aceites esenciales son derivados de fenilpropanoides o terpenoides. Los terpenoides se derivan de unidades de isopreno y los fenilpropanoides se forman a partir de ácido siquímico, que forman las unidades básicas de ácido cinámico y ácido p-cumárico como lo evidencia la Figura 1 (Avila y Soares, 2007).

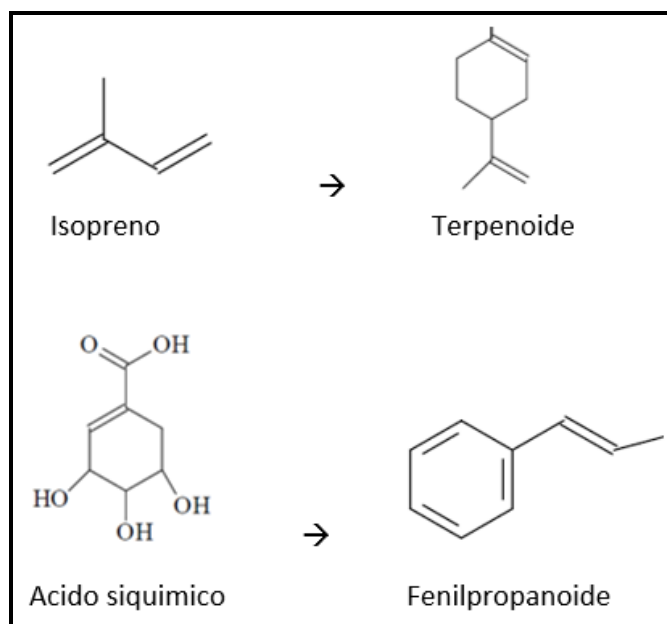


Figura 1. Origen de los terpenoides y fenilpropanoides. (Tomado de Avila y Soares, 2007).

Estas mezclas de AE pueden contener aproximadamente entre 20 - 60 componentes en concentraciones muy diferentes así mismo se caracterizan por tener dos o tres componentes principales en concentraciones altas (entre un 20 - 70%) en comparación con otros componentes que se encuentran en cantidades traza. Dentro de estos, se evidencian algunos ejemplos como los principales componentes de AE de *Origanum Compactum* en lo que se obtiene el carvacrol (30%) y el timol (27%), en el AE de *Coriandrum sativum* se encuentra el linalol (68%), en el de *Artemisia herba-alba* se encuentra la  $\alpha$ - y  $\beta$ - tujona (57%) y el alcanfor (24%), en el *Cinnamomum camphora* se encuentra 1,8 - cineol (50%), en el de *Anethum graveolens* se encuentra  $\alpha$ - felandreno (36%) y lomoneno (31%) en la hoja y en las semillas se encuentra carvona (58%) y limoneno (37%) y en el de la *Mentha piperita* se encuentra el mentol (59%) y mentona (19%). Estos componentes principales determinan generalmente las propiedades biológicas de los AE, incluyen dos grupos distintos de origen biosintético (Croteau et al., 2000; Betts., 2001; Bowles, 2003; Pichersky et al, 2006).

El grupo principal se compone de terpenos y terpenoides y los otros componentes son aromáticos y alifáticos, todos caracterizados por bajo peso molecular, se muestran sus estructuras químicas en las Figuras 2, 3 y 4.

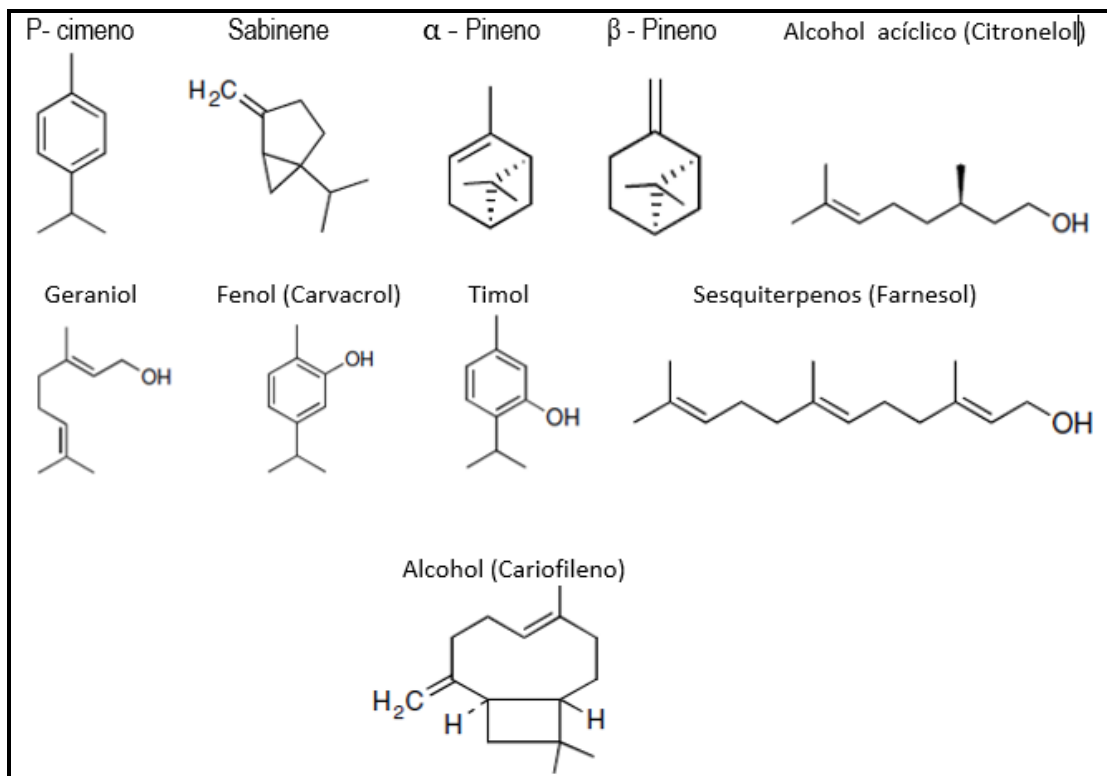


Figura 2. Terpenos – Monoterpenos. Estructura química de los componentes de los aceites esenciales.

(Tomado de Bakkali et al., 2007)

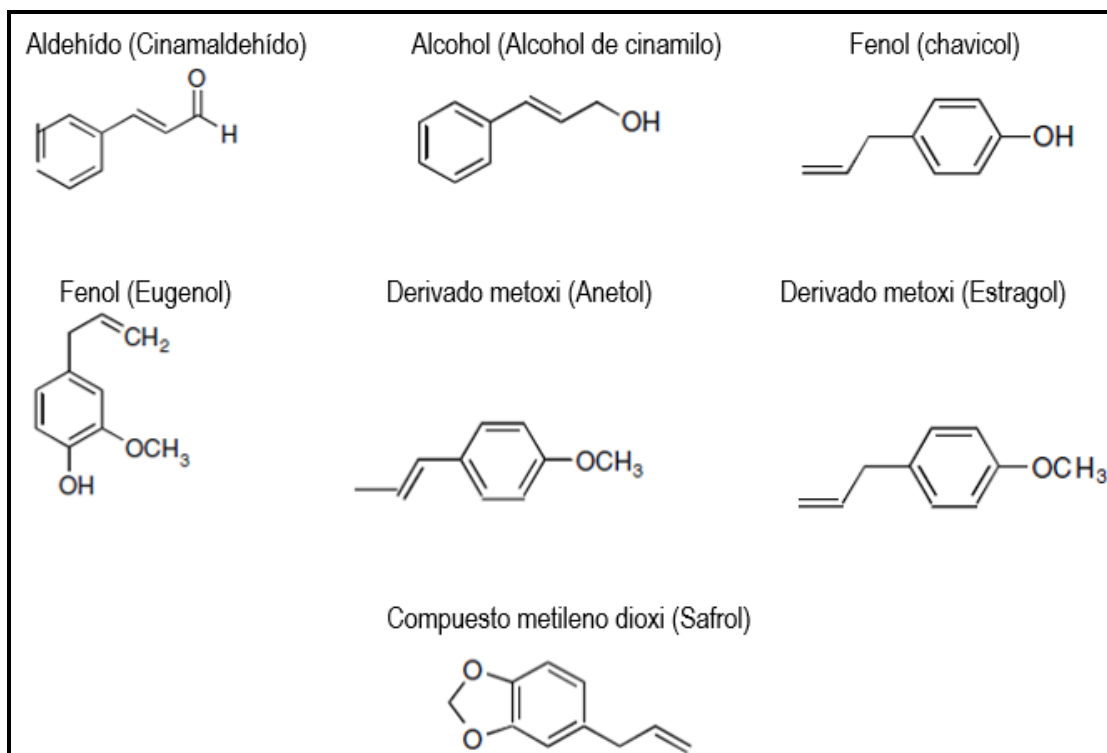


Figura 3. Compuestos aromáticos. Estructura química de los componentes de los aceites esenciales.

(Tomado de Bakkali et al., 2007)

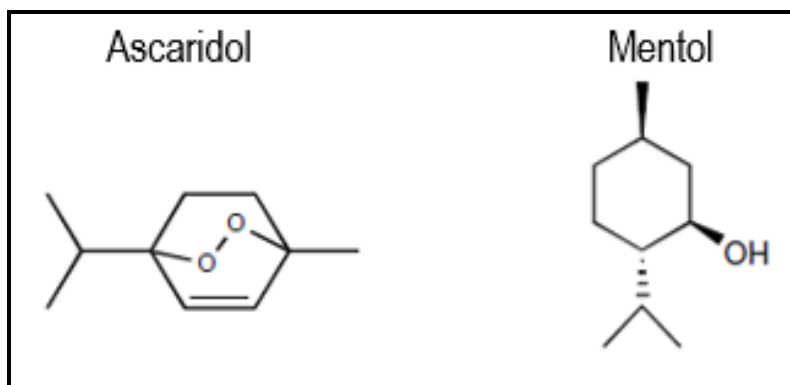


Figura 4. Terpenoides (Isoprenoides). Estructura química de los componentes de los aceites esenciales.

(Tomado de Bakkali et al., 2007)

### 2.1.2 Modo de acción

Los terpenoides y fenil terpenoides se acumulan en la bicapa lipídica de la bacteria, esta actividad se debe a la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos cíclicos, que les permiten interactuar con las membranas celulares y de esta forma se acumulan en la bicapa lipídica ocupando un espacio entre las cadenas de ácidos grasos (Ultee et al., 1999). “Esta interacción provoca cambios estructurales de la membrana, lo que resulta en su expansión” (Griffin et al., 1999); “De esta manera, alterando su estructura tiene un efecto adverso sobre la estabilidad membranal generando una pérdida de iones a través de la misma” (Polin et al., 2014). La pérdida de iones causa una disminución en el gradiente iónico generando una desestabilidad transmembranar provocando así la muerte del microorganismo, sin embargo, algunas bacterias pueden contrarrestar estos efectos mediante el uso de las bombas iónicas evitando así la muerte celular así grandes cantidades de energía son destinadas a esta función por lo que el crecimiento bacteriano disminuye ralentizándolo como se evidencia en la Figura 5 (Cox et al, 2001).

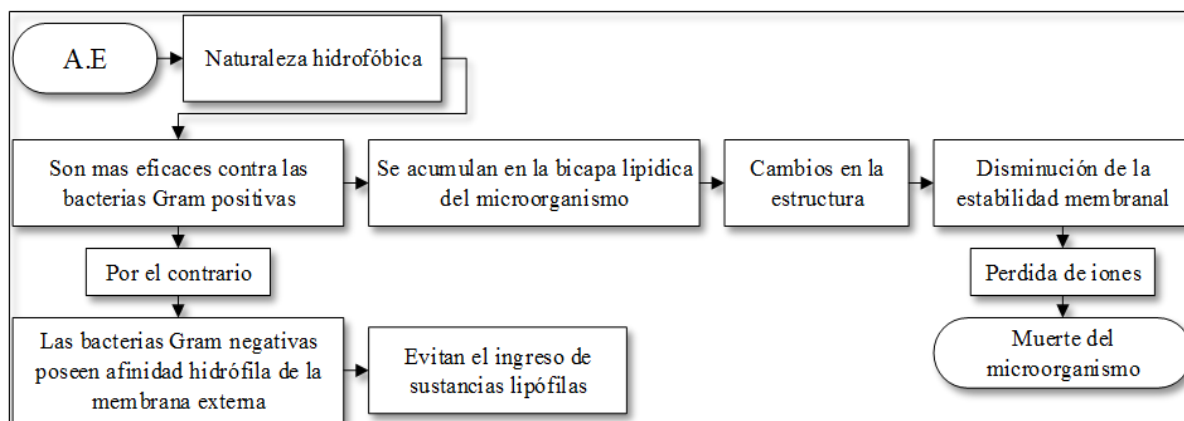


Figura 5. Modo de acción de los aceites esenciales. (Fuente: propia)

“Los aceites esenciales son más eficaces contra las bacterias Gram-positivas, donde la membrana interactúa directamente con los compuestos hidrofóbicos de los AE” (Cimanga et al., 2002). “Por el contrario, la pared celular externa de las bacterias Gram-negativas posee afinidad hidrófila y no permite el ingreso o el tránsito de sustancias lipófilas” (Cox et al, 2001); Sin embargo, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, no es completamente impermeable a las sustancias hidrófobas ya que moléculas de bajo peso molecular puede interactuar con el agua a través de puentes de hidrógeno cruzando así la pared celular por difusión a través de la capa de lipopolisacáridos o por medio de proteínas de membrana y posteriormente interactuar con la bicapa lipídica de las células (Griffin et al., 1999). Según estudios realizados por Helander et al. (1998) se evidenció la capacidad del timol y carvacrol para desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, por lo tanto el bajo peso molecular de estos compuestos puede permitir que sean activos en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas disminuyendo la selectividad de estos compuestos frente a poblaciones específicas haciendo así más difícil la modulación de la fermentación. En otras investigaciones realizadas por Gustafson y Bowen (1997) informaron del potencial de los AE para coagular algunos componentes celulares, sugiriendo la desnaturalización de la proteína y otras moléculas activas a nivel biológico como son las enzimas. Los fenoles interactúan con las proteínas a través de puentes de hidrogeno e

interacciones iónicas o hidrófobas (Prescott et al., 2004), “por el contrario, los compuestos no fenólicos interactúan a través de otro grupo funcional como el grupo carbonilo de cinamaldehído” (Ouattara et al., 1997). En estudios realizados por Wendakoon y Sakaguchi (1995) “demostraron que los componentes activos de AE de canela y clavo podrían unirse a las proteínas e inhibir la actividad enzimática de *Enterobacter Aerogenes*”. En el estudio realizado por Skandamis y Nychas, (2000) “determinaron que los efectos de los AE son mayores a bajo pH ya que los microorganismos parecen ser más susceptibles a los AE en un grado de acidez”.

## **2.2 CONSUMO DE MATERIA SECA**

El consumo de materia seca (CMS), se define como la cantidad de alimento consumido durante un periodo de tiempo por parte de un animal, lo cual resulta ser el principio más significativo para el desarrollo productivo de los bovinos (ganancia de peso y producción de leche), seguido de la biodisponibilidad del nutriente para ser asimilado y posteriormente metabolizado. Para que se dé el CMS debe existir interacción entre diversos factores como son: físicos, metabólicos, eficiencia productiva de cada animal la cual puede cambiar dependiendo de variables intrínsecas (raza, sexo, edad, salud, tamaño, peso y estado fisiológico) y de variables extrínsecas (características del alimento palatabilidad, digestibilidad, cantidad de nutrientes) los factores ambientales (temperatura, humedad relativa, fotoperiodo) y manejo (Tarazona et. al., 2012).

Para dar explicación a este proceso se han generado dos teorías de regulación del consumo, que explican la interacción de estos factores anteriormente mencionados como un sistema integrador del consumo. La primera teoría relacionada con la disminución del consumo de alimento es la del llenado físico ruminal la cual depende de la cantidad de forraje que llega al rumen y el tamaño de partícula de la misma, de acuerdo a esto, grandes cantidades de forraje así como un tamaño de partícula grande, pueden causar distensión en el

retículo-rumen, esto suele pasar con la ingestión de forraje o de pastos de mala calidad, lignificados o con un tamaño de partícula superior al que se puede considerar como fibra efectiva. Cuando se ocasiona este tipo de llenado, ello es consecuencia del estímulo de mecanorreceptores, que transmiten un mensaje al sistema nervioso central, motivo por el cual resulta un cese de la ingesta de alimento (Tahir, 2008). Al mismo tiempo, el llenado físico es regulado por la velocidad de desaparición de la digesta que se encuentra dentro del rumen y el paso hacia el abomaso. Esta velocidad de desaparición de la digesta depende del tiempo de digestión, absorción y de retención del alimento en el rumen y de la tasa de pasaje del mismo, parámetros estos, que a su vez dependen de las propiedades físicas y químicas del forraje (Haro, 2002).

La segunda teoría denominada teoría quimiostática, está relacionada con el aumento de metabolitos en sangre, es decir mediada por mecanismos químicos, donde la ingestión de alimentos altamente fermentables o altamente energéticos provocan un efecto de saciedad por un estímulo en el hipotálamo ventromedial. Los metabolitos que tienen efecto en la regulación del consumo son la glucosa (sin embargo esto aplica más en el caso de monogástricos), propionato, ácidos grasos libres y algunos aminoácidos como leucina. Estos metabolitos son oxidados en el hipotálamo y producen la disminución del consumo de alimento (Haro, 2002).

### **2.2.1 Efecto de los aceites esenciales sobre el consumo de materia seca**

“Cuando se implementan dietas con inclusión de aceites esenciales se han presentado efectos diferentes en el CMS, relacionados con el tipo de AE”. En un estudio realizado por Wang et al. (2009) “se suministró una alimentación con 250 mg día de AE proveniente de plantas de orégano en cabras y 2 g de bayas de enebro, con un total de AE en su composición de un 35%, no se encontró influencia en el CMS”. En contraste con investigaciones realizadas por Calsamiglia et al. (2007) “donde la inclusión de AE en ganado de ceba,



evidenció una reducción en el CMS”, “esta reducción podría estar relacionada a problemas de palatabilidad, sugiriendo que el producto necesita ser encapsulado para mejorar este problema. En otro estudio, la adición de aceite de pimienta en dosis de 1 g por día basado en una dieta de ganado de ceba estimuló el consumo y la fermentación ruminal” (Patra, 2011). Dilorenzo (2011) Informó mejoras en la eficiencia de la alimentación de los novillos de engorde alimentados con una mezcla de aceites esenciales (timol, eugenol, vainillina, guayacol, y limoneno) y suplementando con tilosina, en cambio no se encontraron efectos sobre la eficiencia de la alimentación, cuando fueron alimentados sin tilosina y con la mezcla de aceite esencial.

En investigaciones realizadas por Tager y Krause, (2011), se implementó una dieta con relación de 42:58 forraje a concentrado en vacas lecheras Holstein en la que se adicionó AE, como resultado se evidencio que el consumo de materia seca no se vio afectado de forma significativa por los AE, conforme lo indica la Tabla 1. En investigaciones realizadas por Benchaar et al, (2006, 2007b, 2008). “Se evidencian resultados similares al estudio anterior, en este estudio implementaron dietas de 0,75 a 2.0 g/día de AE obteniendo como resultado ausencia de efecto de estos en el consumo de materia seca”.

Tabla 1. *Efecto de los aceites esenciales sobre el consumo de materia seca*

	TRATAMIENTO			$\sigma$	P
	CON	DIE 1	DIE 2		
CMS, kg/d	23.9	23.3	23.2	0.9	0.56

CON = control (sin A.E); DIE 1 = 0.5g/d (85 mg de cinamaldehido y 140 mg de eugenol); DIE 2 = 10g/d (1700mg de cinamaldehido y 2800 mg de eugenol);  $\sigma$  = desviación estándar; Valor de P = Valor de P (probabilidad); (Fuente: Adaptado de Tager y Krause, 2011).

## 2.3 DIGESTIBILIDAD

La digestibilidad es la tasa de eficiencia de un alimento en ser digerido, absorbido y metabolizado por el animal, esta se relaciona con la cinética de la digestión y su tasa pasaje por el rumen, demostrando una estrecha relación con la digestión de la fibra, principalmente,

porque esta limita la tasa de desaparición del material del tracto digestivo. En la estimación de este parámetro se utiliza la proporción de nutrientes presentes en una ración que pueden ser absorbidos y totalmente disponibles para el animal (Merchen, 1993). Los coeficientes de digestibilidad están determinados por diferentes métodos y se expresan como real o verdadera (DR) y aparente (DA); el valor que expresa la DR de un alimento es superior al de DA, ya que en este no se toman en cuenta los residuos metabólicos de la vaca, sino que se refleja la desaparición neta de materia orgánica atribuida al proceso de digestión. Es difícil cuantificar con exactitud las cantidades de origen endógeno de un determinado elemento presente en las heces, ocasionando la subestimación de su digestibilidad verdadera. Los valores estimados de digestibilidad aparente de las fracciones correspondientes a proteínas y lípidos, sin incluir los aportes de compuestos endógenos de la misma naturaleza, son siempre menores a los coeficientes de digestibilidad verdadera. Por lo que un dato de gran utilidad al trabajar con rumiantes es que el aporte de nitrógeno endógeno se encuentra alrededor de 0,5 a 0,6 g por 100 g de materia seca consumida (aproximadamente un 4% de la proteína de la ración), por lo que los coeficientes de digestibilidad aparente en raciones con un contenido de proteína inferior al 4%, pueden llegar a ser negativos (Bondi, 1989).

### **2.3.1 Efecto de los aceites esenciales sobre la digestibilidad de la materia seca y de nutrientes**

En investigaciones realizadas por Tager y Krause, (2011) la digestibilidad total de nutrientes y la desaparición *in-situ* de la materia seca, la materia orgánica, la fibra detergente neutra, la fibra detergente acida, la proteína bruta y el almidón, realizado en vacas lecheras de raza Holstein alimentadas con una dieta con una relación 42:58 de forraje a concentrado, teniendo cuatro tratamientos que se ilustran en la Tabla 2. Como resultado se evidencia que los AE no tuvieron ningún efecto significativo sobre la digestibilidad total de la alimentación. En otros estudios realizados por Benchaar et al. (2006) se evidenció que al adicionar en la

dieta de vacas lecheras una mezcla de AE que contenía timol, eugenol, vainillina y limoneno suministrando 2.0 g/día y otra con una mezcla de AE que contenía timol, eugenol, vainillina, guayacol y limoneno suministrando 0.75 g/día no revelaron efectos sobre la digestibilidad de la MS, FDN, FDA, PB y el almidón. Así mismo Benchaar et al. (2008), informaron que al adicionar cinamaldehido (1 g/día por vaca) no lograron tener ningún efecto sobre la digestibilidad *in-situ* de la harina de soja en el ganado lechero lactante. Por otra parte Tager y Krause (2010), realizaron un estudio de cultivo continuo con dosis de 500 mg/L en el cual la adición de cinamaldehido tendió a disminuir la digestibilidad de la MO y tanto el cinamaldehido como el eugenol tendieron a disminuir la digestibilidad de la FDN y la FDA, logrando un efecto negativo sobre la digestibilidad de estas fracciones.

Tabla 2. *Digestibilidad total de la MS y sus fracciones*

Digestibilidad total del tracto, (%)	TRATAMIENTO				$\sigma$	P
	CON	DIE 1	DIE 2	DIE 3		
MS	51.4	51.9	53.8	53.0	3.4	0.75
MO	52.6	53.7	55.5	55.3	3.4	0.68
FDN	29.6	27.4	35.4	30.3	6.0	0.73
FDA	30.4	28.2	32.5	31.6	4.5	0.77
PB	51.3	46.4	52.3	50.9	5.1	0.54
Almidón	87.6	89.2	88.3	90.8	3.2	0.76

MS = materia seca; MO = materia organica; FDN = fibra detergente neutra; FDA = fibra detergente acida; PB = proteína bruta; CON = control (sin A.E); DIE 1 = 0.5g/d (85 mg de cinamaldehido y 140 mg de eugenol); DIE 2 = 10g/d (1700mg de cinamaldehido y 2800 mg de eugenol); DIE 3 = 0.25 g/día (pimienta);  $\sigma$  = desviación estándar; Valor de P = Valor de P (probabilidad); (Fuente: Adaptado de Tager y Krause, 2011).

## 2.4 DEGRADABILIDAD RUMINAL

La degradabilidad ruminal o la tasa de digestión se refiere a la degradabilidad total o a la desaparición de la MS que se expresa en un modelo de regresión por  $a + b$  y que no puede ser superior a 100, donde (a) es igual a la intersección de la curva de degradación en el tiempo cero, que corresponde a la fracción soluble en agua del componente nutricional y (b) es igual al potencial de degradabilidad del componente de la fracción insoluble en agua. Así mismo,

se tiene que  $100 - (a + b)$  representa la fracción no degradable en el rumen. En la práctica, a través de la técnica de los sacos de nylon se logra de determinar la degradabilidad de la materia seca de los alimentos utilizados y sus respectivas fracciones como lo son la PB y FDN. La desaparición de las fracciones se obtiene por la diferencia del peso inicial y final, posteriormente, se calcula el porcentaje del alimento y su fracción degradada en rumen. Así mismo la degradabilidad potencial de la proteína representa la cantidad de proteína que puede ser disuelta y degradada en el rumen en un tiempo determinado. Por otro lado, la degradabilidad efectiva representa la cantidad de nutriente que realmente se degrada en el rumen y se define por el tiempo durante el que este se encuentra presente en el rumen. Esta degradabilidad efectiva es variable y cuanto menor sea la tasa de rotación de la digesta ruminal, mayor será el valor de esta degradabilidad efectiva (Ørskov et al., 1980).

La degradación es uno de los factores cuantitativos más importantes que determinan el valor nutricional de la proteína en la alimentación, el suministro de amoníaco, péptidos y ácidos grasos de cadena ramificada para los microorganismos ruminales y el paso de proteínas no degradables en el intestino (Hvelplund y Weisbjerg, 2000). En la degradación ruminal de la proteína se considera que la proteína bruta (PB) del alimento, difiere mucho entre sí con relación a las tasas de degradación y que la desaparición ruminal de la proteína es el resultado de dos actividades simultáneas, la degradación y la tasa de pasaje (NRC, 2001).

En la degradación de los carbohidratos, se debe tener en cuenta que cuando se suministran granos intactos con la cubierta cerosa de pericarpio, este debe ser degradado o eliminado para que así las bacterias amilolíticas sean capaces de comenzar a degradar el endospermo del grano rico en almidón (Huntington, 1997). Otras formas de mejorar el rendimiento de degradación en el rumen de los carbohidratos, como el almidón, es haciéndolo más biodisponible para la degradación enzimática de las bacterias ruminales, mediante procesamiento del grano, abriendo el pericarpio o gelatinizando el almidón (Horadagoda et

al, 2008; Owens et al, 1986). “Como las bacterias amilolíticas metabolizan el material de hexosa, producen principalmente el ácido propiónico y láctico” (Russell, 2002).

“En la degradación de carbohidratos estructurales, como lo son la celulosa y la hemicelulosa, las bacterias celulolíticas comienzan a adherirse a las partículas del alimento” (Allen y Mertens, 1988). Las bacterias comienzan entonces la secreción de enzimas como la celulasa para degradar los hidratos de carbono estructurales de la pared celular, estas enzimas bacterianas son capaces de degradar los enlaces  $\beta$  1 – 4 de las cadenas de glucosa rectas que componen la celulosa (Krause et al., 2003).

## **2.5 TASA DE PASAJE**

Conocer la tasa de pasaje de los alimentos en el rumen es importante para la comprensión de los diferentes aspectos de la digestión, como por ejemplo realizar una estimación de la utilización de las proteínas y el flujo de la digesta (Owens y Hanson, 1992). La tasa de pasaje o tránsito se refiere al flujo de los residuos no digeridos a través del tracto digestivo incluyendo el rumen, además de fibra no digestible, bacterias y otras fracciones no degradadas del alimento. Sumado a esto, la composición y volumen de la dieta, son variables externas que influyen en la digestión y su velocidad (Van Soest, 1994). De igual manera Kristensen et al., (1982) “mencionan que la tasa de pasaje es la cantidad de alimento que permanece en el rumen durante un periodo de tiempo determinado, expresando la velocidad de paso de dicho alimento”. Por otra parte, este componente de la cinética ruminal nos indica que la digestibilidad de la fibra disminuye a medida que se incrementa la tasa de pasaje, así mismo, como la demanda energética de mantenimiento está relacionada con el peso corporal, la capacidad de digerir la fibra tiende a aumentar con el incremento de la masa corporal debido a que la tasa de pasaje se reduce con relación a la demanda de energía (Demment y Van Soest, 1982).

“La tasa de pasaje por el tracto gastrointestinal depende de muchos factores. Cuanto más grande sea el tamaño de partícula, más tiempo tardará en pasar a través del rumen, al contrario de los fluidos que se destacan por tener las más altas tasas de pasaje” (Owens y Hanson, 1992). Existen otros factores que pueden afectar la digestibilidad a través de su efecto sobre la tasa de pasaje como lo son: el tamaño inicial de la partícula suministrada en la dieta, la velocidad de degradación de dichas partículas y así mismo la gravedad específica que es la relación de la densidad de un fluido respecto a la densidad del agua (Sissons et al., 1984). Owens y Goetsch (1988), “mencionan que los factores que influyen en la tasa de pasaje de la fase líquida en el rumen son: el nivel de ingesta, la proporción de concentrado, el indicador utilizado y el sitio de muestreo”. La tasa de pasaje de las partículas al depender de los factores anteriormente descritos, evidencia las grandes diferencias que existen entre la fibra y el concentrado y el comportamiento de dichas partículas del alimento en cuanto a la cinética ruminal (NRC, 2001). La estimación del paso de las partículas de alimento se realiza por medio de modelos de cinética de la digesta e implementación de marcadores, que al ser medidos posteriormente al proceso digestivo, determinan las tasas de pasaje del alimento y así mismo el tiempo de retención (Moore-Colyer et al., 2003). “El uso de marcadores como método para medir las tasas de pasaje es el menos invasivo para el animal, además de esto el individuo puede expresar su comportamiento normal” (Owens y Hanson, 1992). “Existen variedades de marcadores, como por ejemplo la tinción de las partículas y también elementos de tierras raras los cuales se han utilizado en investigaciones de la digesta” (Huhtanen y Kukkonen, 1994). Ellis et al., (1984) afirmaron que un indicador apropiado debe comportarse exactamente igual a las partículas de los alimentos y no alterar el proceso normal de la mezcla para así lograr una estimación de la fracción de flujo sin digerir a través del compartimiento, el indicador debe unirse al residuo de partículas sin digerir y no influir en el

flujo de la partícula marcada con el objetivo de evaluar los efectos de diferentes niveles de alimento sobre las tasas de pasaje.

## **2.6 EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES SOBRE PARÁMETROS DE CINÉTICA RUMINAL**

En investigaciones realizadas por Metwally et al., (2016) se utilizaron 6 vacas lecheras de aproximadamente 650 kg a las cuales se les adicionó en la dieta una mezcla de AE (Crina® Rumiantes) el cual se encontraba constituido por timol, m-cresol, guayacol, eugenol y resorcinol con un consumo diario aproximado de MS de 7,0 kg, suministrados en dos porciones diarias. Cada porción base de MS constaba de 2.24 kg de ensilado de pasto, ensilado de 0.5 kg de Maíz, harina de soja 0.22 kg, harina de colza de 0.22 kg, trigo 0.22 kg, mezcla de vitaminas y minerales 25g. La mezcla de AE se añadió individualmente adicionando 0.5 g por ración, en este caso, la ración totalmente mezclada tuvo un periodo de adaptación de 30 días. Durante el periodo experimental 3 animales recibieron el tratamiento control sin AE, mientras que los otros 3 animales fueron expuestos a las dietas suplementadas con AE. Se obtuvo como resultado que no hubo un efecto significativo en la adición de los AE en la degradabilidad in-situ de la MS de la ración totalmente mezclada, sin embargo se evidenció un efecto negativo sobre la degradabilidad de la fibra, esto se observó en la proteína bruta del ensilaje de pasto que fue degradada en un 58.59 % en tratamiento control mientras que con la adición de los AE se redujo la degradabilidad a un 54.49 %. Por otro lado, en otras investigaciones realizadas por Tager y Krause, (2011) “indicaron que altos niveles de AE afectaban negativamente la degradación de la fibra ruminal atribuyendo esto a la inhibición de las bacterias celulolíticas”. En contraposición, en estudio realizado por Benchaar et al., (2003) “reportaron que no se observó ningún efecto de la suplementación de AE en el recuento de bacterias celulolíticas en vacas lecheras”. En otra investigación realizada por McIntosh et al., (2003) se observó que al adicionar 110 mg de AE (Crina®

Rumiantes) en vacas en crecimiento, se inhibieron las bacterias hiperproductoras de amoníaco sugiriendo que el principal efecto del AE se produjo en la fase final de la degradación de las proteínas. Por otra parte, cabe resaltar que la tasa de pasaje del contenido ruminal varía de acuerdo a la dieta, donde el tiempo medio de retención en el retículo-rumen se encuentra en un intervalo de 10 a 24 horas para el agua y los elementos solubles incluyendo los microorganismos ruminales, mientras que los elementos insolubles de alta o baja digestibilidad poseen una vida media aproximada de 30 y 50 horas, respectivamente (Relling y Mattioli, 2003). El efecto de la inclusión de los aceites esenciales en la dieta, según estudios realizados por Hart et al., (2008), se evidencia en la digestibilidad del alimento reduciendo la degradación proteica, inhibiendo las bacterias productoras de nitrógeno y así mismo reduciendo la degradación de los almidones como una respuesta a la inhibición de los organismos amilolíticos por lo que favorece el flujo de estos dos nutrientes al intestino. La alimentación con una mezcla de aceites esenciales (Crina®) en una adición de 1 g/día decrece la digestibilidad de la materia seca atribuyendo esto a la disminución de la digestibilidad de la fibra a nivel ruminal. De acuerdo con la información anteriormente descrita se puede evidenciar que los aceites esenciales al tener un efecto en la disminución de la digestión y degradabilidad de los nutrientes como las proteínas y los almidones tienen un efecto indirecto sobre la tasa de pasaje (Beauchemin et al., 2009).

## **2.7 PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL AMBIENTE RUMINAL**

“La fermentación en el rumen del bovino es posible gracias a la variedad de microorganismos presentes en dicho compartimiento, los cuales son indispensables para llevar a cabo todos los procesos fermentativos de los alimentos” (Relling y Mattioli, 2003). Como el rumen no es un órgano glandular, no secreta enzimas digestivas, por esta razón es



necesario que los microorganismos actúen directamente sobre el alimento para degradarlo y aportarle los nutrientes necesarios al animal.

Existen parámetros de fermentación ruminal, que hacen posible que el medio ruminal esté estable y le brinde un adecuado ecosistema para los microorganismos ruminales con el fin de que estos puedan degradar los diferentes sustratos que llegan a este medio, dentro de estos se encuentran: la **Temperatura**, la cual es un factor que condiciona el desarrollo de los microorganismos ruminales y se mantiene en un rango de 38 a 42°C con un promedio de 39°C, dependiendo de las reacciones químicas dentro del rumen y la regulación térmica del animal (Relling y Mattioli, 2003); el **pH ruminal**, es otro parámetro de gran importancia, el cual debe mantenerse controlado, recordando que este oscila entre los rangos óptimos de 5.5 a 6.9 para que los alimentos sean degradados adecuadamente por los microorganismos. El pH ruminal varía principalmente según el tipo de alimento, la forma y la frecuencia como este es ofrecido. Las raciones altas en carbohidratos no estructurales o rápidamente fermentables disminuyen el pH, mientras que las dietas ricas en carbohidratos estructurales, tienden a regularlo en su límite superior (Cerrato y Calsamiglia, 2003).

### **2.7.1 Microorganismos responsables de la digestión fermentativa**

El rumen constituye un medio favorable y puede considerarse como una cámara de cultivo continuo y de gran eficacia para el desarrollo de microorganismos anaerobios. Los agentes responsables por la fermentación ruminal son microorganismos unicelulares representados por bacterias, protozoarios y hongos. En términos cuantitativos, 60 a 90% de la masa microbiana ruminal es conformada por bacterias, 10 a 40% por protozoarios ciliados y el resto 5 – 10% por hongos (Van Soest, 1994).

**2.7.1.1 Bacterias.** “La densidad bacteriana puede ir desde 10.000.000.000 a 100.000.000.000/mL de contenido ruminal” (Grudsky et al., 1983). Dentro de las bacterias ruminales se encuentran: las **Celulolíticas**, Las cuales fermentan hidratos de carbono

estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas) y como producto final de su metabolismo generan ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente, acetato (Olivera et al., 2007). Las especies celulolíticas de importancia son, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus Flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Clostridium loch headii* y *Cillobacterium cellulosolvens* (Grudsky et al., 1983). Las bacterias **Hemicelulolíticas**, son organismos que usualmente hidrolizan celulosa y también pueden utilizar la hemicelulosa, dentro de las especies más importantes degradadoras de hemicelulosa se encuentran, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospira multiparus* y *Bacteroides ruminicola* (Grudsky et al., 1983). “Las bacterias **Amilolíticas** predominan cuando se suministra en la dieta grandes cantidades de almidón” (Hobson y Wallace, 1982), estas, “fermentan hidratos de carbono de reserva de los granos (almidón) y como producto final de su metabolismo generan AGCC, principalmente, propionato” (Olivera et al., 2007). “Las especies más importantes que pueden digerir el almidón son: *Bacteroides amylophylus*, *Succinomonas amylolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Bacteroides ruminicola*.” (Grudsky et al., 1983).“ Existen otras bacterias de gran importancia, como las bacterias **Lipolíticas**, las cuales metabolizan grasas y como producto final de su metabolismo generan ácidos grasos libres y AGCC (especialmente propionato)” (Olivera et al., 2007). “Las **Proteolíticas** degradan proteínas y como producto final de su metabolismo generan AGCC y amoníaco (NH<sub>3</sub>)” (Olivera et al., 2007). Por otro lado, “las **bacterias sintetizadoras de vitaminas**, como *Selenomonas ruminatum* son de gran importancia ya que sintetizan vitaminas del complejo B y la proporcionan al rumiante” (Grudsky et al., 1983).

**2.7.1.2 Protozoarios.** “Los protozoarios ingieren partículas de alimentos y atacan los principales componentes de los vegetales, incluyendo celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, azúcares solubles y lípidos” (Hobson y Wallace, 1982). Los protozoos que hacen parte de la microbiota ruminal, se desarrollan perfectamente a pH superior a 6. Normalmente,

son adquiridos por el ternero al consumir agua o por contacto directo con otros rumiantes. Los protozoos son beneficiosos al moderar la fermentación amilolítica, debido en parte a que consumen preferentemente bacterias amilolíticas y además, ingieren y engloban los trozos de almidón que pasan al intestino dentro del protozoo evitando una fermentación ácido láctica, suministrando de esa forma, una fuente directa de glucosa para el animal. Los protozoos favorecen al rumiante aumentando el valor biológico de la proteína, pero a un elevado costo energético por el reciclaje de nitrógeno, como se evidencia en la figura 6 (Relling y Mattioli, 2003). Algunos de los protozoarios más importantes del rumen son: *Entodinium bovis*, *Isotricha intestinalis*, *E. caudatum*, *E. chatterjeei*, *Diplodinium dendatum*, *Polyplastrotn multivesiculatum* (Olivera et al., 2007).

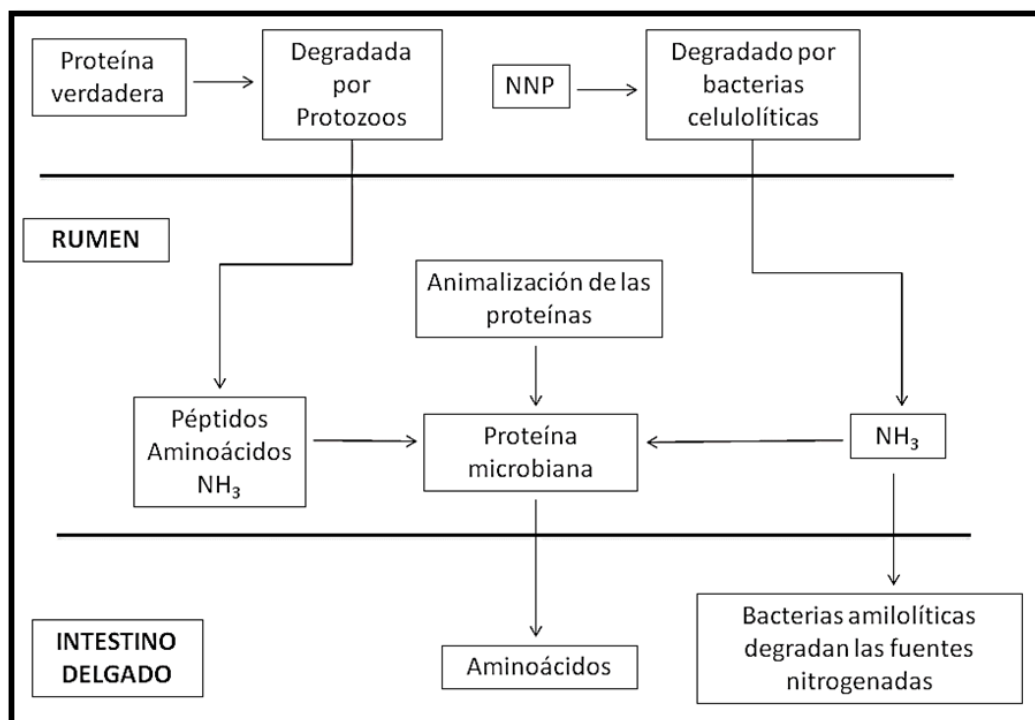


Figura 6. Incremento del valor biológico de la proteína por acción de los protozoos. (Fuente: propia)

Los protozoos consumen las bacterias como su principal fuente de proteína y en investigaciones en las que se ha realizado defaunación de estos protozoarios, resulta en un incremento en la síntesis de proteína microbiana y su flujo desde el rumen hasta el duodeno (Williams y Coleman, 1992). En estudios realizados por Belanche et al. (2012) Informan que

los protozoos tienen un efecto negativo en la eficiencia energética general del ecosistema ruminal y al provocar su defaunación se modifica la composición de las bacterias del rumen, y así mismo esta oferta de proteína bacteriana en el duodeno lo que promueve un incremento en los aminoácidos como la leucina, treonina y arginina, sin embargo, Hristov y Jouany (2005) mencionan que no se incrementa la lisina que es el principal aminoácido limitante en animales de alta producción. En otras investigaciones realizadas por Ivan (2009) se evidencia que al realizar un experimento in vivo inoculando ovejas con diferentes especies de protozoos en los que se encontraban *Isotricha intestinalis*, *Dasytricha ruminantium*, *Polyplastron Multivesiculatum*, *Epidinium ecaudatum*, *Eudiplodinium Maggi*, y *Entodinium caudatum*, los protozoos de la subclase Holotrichia lograron engullir solo un pequeño número de bacterias ruminales por lo que poseen un ligero efecto en el flujo duodenal de nitrógeno sin amoníaco y el metabolismo de las proteínas, así mismo, se evidenció que esta subclase de protozoos no revelaron ningún efecto significativo sobre la digestión de la fibra. En investigaciones realizadas por Williams y Coleman (1992) se indicó que la presencia de los protozoos Holotricha en el rumen poseía poco valor productivo en los rumiantes a excepción de implementar dietas ricas en hidratos de carbono en cuyo caso son beneficiosos al englobar las partículas de almidón aportando una fuente directa de glucosa en el intestino. Esta capacidad de englobar los carbohidratos rápidamente fermentables impide que se produzca una fermentación bacteriana que disminuya el pH provocando un incremento en la concentración de ácido láctico y posteriormente desencadenar una acidosis ruminal (Mackie et al., 1978). Por otra parte, los protozoos con actividad celulolítica como los *Polyplastron*, *Epidinium*, y *Eudiplodinium* poseen mayor protagonismo cuando los animales son alimentados con dietas ricas en fibra, cabe resaltar que protozoos como el *Entodinium spp.* poseen un potencial considerable para engullir y degradar bacterias por lo que en un escenario en el que los animales son alimentados con dietas bajas en proteína sus efectos positivos sobre la fibra

serían contrarrestados por la sensibilidad de las bacterias y hongos a la escasez de nitrógeno en el rumen (Belanche et al., 2012).

Por otra parte, según los estudios realizados por Williams y Coleman. (1992) indicaron que en los efectos de la defaunación de los protozoos cuando hay una adición de fuentes lipídicas, se evidencia una actividad lipolítica por parte de los protozoarios, sin embargo, su papel en el proceso de biohidrogenación aún no es claro. Yáñez-Ruiz et al. (2006) “reportaron que los protozoos no contribuyen de manera significativa al flujo de ácidos grasos insaturados que salen del rumen”. En una investigación realizada por Huws et al. (2009) donde alimentaron novillos a los cuales se les suministró en las dietas diferentes niveles de clorofila, se evidenció que los altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados en células de protozoarios se encontraban aparentemente relacionados con la ingestión de los cloroplastos. En una investigación posterior realizada por Huws et al. (2012) “sugirieron que esta absorción de cloroplastos parecía ser específica de los Entodiniomorfos ya que no se encontraron cloroplastos englobados por los protozoos de la subclase Holotricha”. En otros estudios realizados por Guyader et al. (2014) se observó una reducción de las emisiones de metano adicionando lípidos como estrategia de control de protozoos y mitigación de metano informando que el efecto antiprotozoario de los lípidos depende de la composición de los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico y el linolénico demostrando un efecto positivo en la reducción de metano. “Este efecto en la reducción del metano se debe al efecto tóxico que proporcionan los ácidos grasos poliinsaturados sobre las bacterias celulolíticas y los protozoos” (Nagaraja et al., 1997; Doreau y Ferlay, 1995).

**2.7.1.3 Hongos.** Los hongos representan alrededor del 8% de la biomasa ruminal, poseen una importante actividad celulolítica, en especial cuando el rumiante consume forrajes demasiado maduros o muy lignificados. Los hongos no predominan en el rumen debido a su baja tasa de multiplicación en comparación con las bacterias, algunas de las cuales a su vez

reprimen su crecimiento como el *Ruminococcus spp.* (Relling y Mattioli, 2003). “Algunos de los hongos del rumen del bovino son: *N. hurleyensis*, *Sphaeromonas communis*, *Orpinomyces bovis*, *Anaeromyces mucronatus*” (Olivera et al., 2007).

### **2.7.2 Productos de la fermentación ruminal**

“La fermentación que ocurre durante el metabolismo de los carbohidratos ingeridos por los rumiantes, es un proceso anaerobio, efectuado por la población microbiana ruminal” (Owens y Goetsch, 1988). “Los microorganismos, a través de sus vías metabólicas de extracción de energía y mediante la fermentación anaeróbica, convierten los carbohidratos en ácidos grasos de cadena corta, formando principalmente los ácidos acético, propiónico y butírico” (Eun et al., 2004). “Dentro del proceso fermentativo, también son producidos gases tales como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en 60% aproximadamente y metano (CH<sub>4</sub>) en 30 a 40% dependiendo de la concentración y proporciones relativas de los ácidos grasos producidos” (Owens y Goetsch, 1988; Eun et al., 2004). Por otro lado, cantidades variables de H<sub>2</sub> se originan de las reacciones de descarboxilación, durante la fermentación y de las reacciones de neutralización de H<sup>+</sup> por el bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) proveniente de la saliva o secretado por el epitelio ruminal, durante la absorción de los ácidos grasos de cadena corta. El metano se origina de la reducción del CO<sub>2</sub> y formado por las *Arqueias* metanogénicas siendo estas microorganismos procariontes (Eun et al., 2004).

#### **2.7.2.1 Ácidos grasos de cadena corta (AGCC).**

Los carbohidratos son la fuente principal de energía para los microorganismos ruminales. Los microorganismos ruminales fermentan los carbohidratos para obtener como producto final los AGCC (acético, propiónico y butírico), principal fuente de energía para los rumiantes, que son absorbidos a través de la pared del rumen. La mayoría del ácido acético y todo el propiónico son transportados al hígado, mientras que la mayoría del ácido butírico se convierte en la pared del rumen en cuerpos cetónicos (Wattiaux y Armentano, 1994). “Las

dietas con alto contenido proteico también contribuyen a la producción de AGCC a través de la degradación de los aminoácidos hasta metabolitos secundarios capaces de convertirse en AGCC” (Forrest y Walker, 1971).

**Producción de ácido acético.** El ácido acético es producido en el rumen por la vía del piruvato, mediante las reacciones de descarboxilación oxidativa, que suministra acetato, CO<sub>2</sub> e hidrogeno y a través de la reacción que suministra acetato y formiato, en este caso, el formiato es metabolizado a CO<sub>2</sub> e hidrogeno dentro de las células que lo producen o por otros microorganismos en el líquido ruminal. El formiato es un buen sustrato para la producción de metano por parte de las *Archaeas* metanogénicas como se evidencia en la Figura 7. Además, la producción de acetato en el rumen proporciona el mayor porcentaje de energía requerida por el rumiante y cuando es absorbido pasa directamente al torrente sanguíneo prácticamente sin ningún cambio (Grudsky et al., 1983). De forma práctica, “cuando se suministra al animal forraje finamente picado, la producción de ácido acético se ve disminuida en relación a los otros ácidos” (Meyer et al., 2009).

**Producción de ácido propiónico.** Existen dos vías para la producción de propionato en el rumen, una es la descarboxilación del succinato que es el principal precursor del propionato y la otra es a través de la reducción del lactato por la vía del acrilato como se observa en la Figura 7. Los principales microorganismos productores de propionato en el rumen son *Selenomonas ruminatum* y *Megasphaera elsdenii*. Se puede decir, que tan solo un 5% del propionato es metabolizado por el epitelio ruminal a lactato, de esta manera la mayor parte del propionato, es transportado al hígado, donde junto con los aminoácidos no esenciales se torna en la principal fuente de energía para el rumiante mediante la vía de gluconeogénesis (Grudsky et al., 1983). “El incremento del ácido propiónico se genera al aumentar la cantidad de concentrado o carbohidratos rápidamente fermentables en la dieta” (Bath y Rook. 1965).

**Producción de ácido butírico.** “La producción del ácido butírico procede de forma principal vía producción de Acetil-CoA a partir del piruvato y del acetato extracelular” como se observa en la Figura 7 (Grudsky et al., 1983). El ácido butírico es transformado en la pared del rumen en cuerpos cetónicos, los cuerpos cetónicos, principalmente el B-hidroxibutirato, salen del hígado sin sufrir ningún cambio importante, estos cuerpos cetónicos son utilizados con mucha facilidad por los tejidos de los rumiantes excepto el hígado, cerebro y epitelio ruminal (Leng y Annison. 1964). “La concentración de ácido butírico y CO<sub>2</sub> induce un aumento en el aporte sanguíneo hacia el rumen facilitando la salida rápida de los productos de la digestión” (Sellers, 1955). Una pequeña cantidad de ácido butírico es utilizado en el hígado, junto con ácidos grasos de cadena larga que se originan en el rumen durante la fermentación, para síntesis de grasas más complejas, también puede ser oxidado produciendo radicales de acetil que se utilizan en el ciclo de Krebs para producción de CO<sub>2</sub> y energía (Barker,1961).



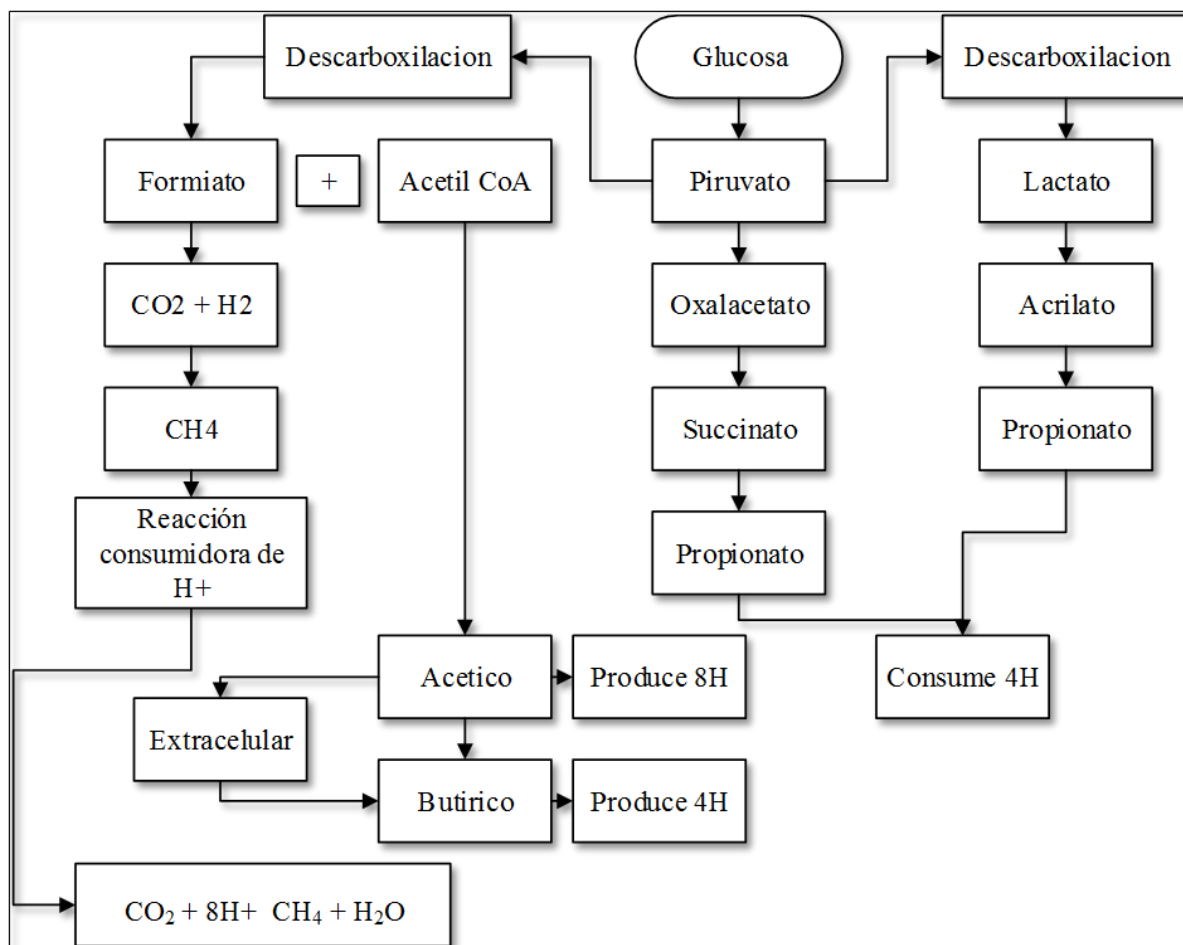


Figura 7. Productos de la fermentación ruminal. (Fuente: propia)

### 2.7.2.2 Formación de metano entérico y su papel en el ecosistema ruminal.

El metano ( $\text{CH}_4$ ) es un subproducto natural de la fermentación microbiana de los carbohidratos y en menor medida de los aminoácidos (AA). El metano se produce en condiciones anaerobias estrictas, por *Archaeas* metanogénicas altamente especializadas, la gran mayoría de la producción de  $\text{CH}_4$  entérico se produce en el retículo-rumen (Muñoz et al., 2012). Las fuentes más relevantes e importantes que influyen en el incremento o la disminución de la producción de metano entérico y su papel en el ecosistema ruminal son: los tipos de carbohidratos fermentados y su proporción e inclusión en las diferentes dietas interactuando y provocando variaciones o alteraciones de pH y de los microorganismos presentes en el líquido ruminal (Beever et al., 1989). Por otra parte, la relación que existe entre los ácidos grasos de cadena corta como productos de la fermentación ruminal, regulan

la producción de hidrogeno que finalmente es uno de los principales sustratos para la formación y producción de metano (Johnson y Johnson, 1995). Según Van Soest (1994) la estequiometria de las reacciones que es representada en un esquema simplificado de forma general de las principales vías de fermentación de hidratos de carbono y la formación del metano que se produce en la región entérica y ruminal es la siguiente:

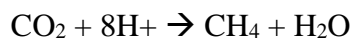
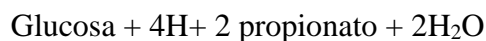


Por lo tanto, los principales productos de la fermentación microbiana de carbohidratos son los AGCC,  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Los alcoholes y el lactato también se sintetizan durante estos procesos, pero cabe aclarar que son relativamente poco importantes en el rumen excepto el lactato en casos de sobreacumulación provocando acidosis. Como lo indicado por Van Soest (1994), el problema básico en el metabolismo anaeróbico es el almacenamiento de oxígeno (es decir,  $\text{CO}_2$ ) y la eliminación de hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) equivalentes (es decir,  $\text{CH}_4$ ). El metano, formado a partir de  $\text{CO}_2$  a través de la vía del formiato, es aceptado directamente por las reacciones producidas en el rumen:



La producción de acetato y butirato que se destaca y es predominante durante la fermentación de carbohidratos fibrosos, resultando en una liberación neta de  $\text{H}_2$  favoreciendo el proceso de metanogénesis. Por otra parte, la formación de propionato es una vía competitiva utilizando  $\text{H}_2$  como sustrato reduciendo su disponibilidad para la metanogénesis. Por lo tanto, la producción de metano depende del equilibrio que existe en el rumen entre el acetato y propionato y el consumo de hidrogeniones libres en el ambiente ruminal (Hegarty 2001) La estequiometria descrita por Van Soest (1994) es la siguiente:





Si se observan las reacciones anteriormente descritas, se evidencia que la formación de metano será mayor en la medida que se incremente la producción de acetato y menor con la producción de butirato. Por otro lado, se consumen hidrogeniones durante la síntesis de propionato compitiendo por este sustrato y reduciendo las emisiones de metano a la atmosfera (Samarini et al., 2011), “por lo que el propionato actúa como un sumidero de H<sub>2</sub>, disminuyendo de ese modo la cantidad total de H<sub>2</sub> disponibles para reducir la síntesis de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>” (Pierre et al, 2013).

### **2.7.3 Efecto de los aceites esenciales sobre los ácidos grasos de cadena corta**

La adición de aceites esenciales en la dieta posee un efecto variable sobre los AGCC, Beauchemin y McGinn (2006) “sugieren que la concentración total de AGCC depende de la composición de la dieta en conjunto con el tipo de aceite esencial y su adición”. En estudios realizados por Mohammed et al. (2004) se evidencia que en una mezcla de aceites esenciales de 750 mg/día se incrementa (+5%) la concentración de AGCC en el rumen de vacas en lactancia junto con ensilaje de alfalfa, por el contrario dichos AGCC tienden a disminuir (-10%) en presencia de ensilaje de maíz.

Estudios realizados por McGuffey et al. (2001) demostraron que ciertos A.E y sus componentes cambian las proporciones molares de los AGCC de una manera similar al de la monensina, disminuyendo el porcentaje de acetato e incrementando el de propionato en rumen. Así mismo Mohammed et al. (2004) “evidenciaron una disminución en la proporción de acetato y un aumento en el porcentaje de propionato tanto in-vitro como in-vivo con aceite de rábano encapsulado en ciclodextrinas”. En otro estudio realizado por Busquet et al. (2005) se utilizó cinamaldehído y aceite de ajo adicionado en las siguientes concentraciones 31,2 y 312 mg/L, en dosis baja de cinamaldehído y dosis alta de AE de ajo lo cual reveló que la

proporción de acetato se redujo mientras que la de propionato incrementó así como la de butirato. El incremento en la concentración de butirato como resultado de la suplementación con algunos compuestos de este AE, sugiere que el modo de acción de estos componentes se diferencia de la monensina. Por otra parte, se puede observar que en la investigación anteriormente descrita se reporta un cambio positivo en el perfil de AGCC y otras investigaciones sugieren cambios indeseables en las concentraciones individuales de los AGCC como se demuestra en un estudio realizado por Castillejos et al. (2006) donde se evidencia que la adición de 500 mg/L de eugenol resultó en reducción de la concentración de propionato sin afectar la concentración total de AGCC. De igual forma, en otro estudio realizado por Cardozo et al. (2005) evidenció que los efectos de los AE en el perfil de AGCC se encuentran ligados al pH, en este estudio *in vitro* se adiciono a la dieta diferentes A.E suministrándolos en diferentes proporciones y evaluando su efecto en conjunto con el pH, como resultado se obtuvo una mayor relación acetato-propionato a pH 7.0 mientras que las dosis de AE expuestas un pH de 5,5 resultaron en la disminución de la relación de acetato-propionato conforme lo indica la Tabla 3. En otras investigaciones donde la adición de los AE se ha realizado en concentraciones bajas, los microorganismos parecen ser capaces de adaptarse a los AE lo que significaría un desafío en la aplicación de esta tecnología en la suplementación bovina, esto se puede observar en un estudio realizado por Cardozo et al. (2004), donde la implementación *in vitro* de los AE de canela, ajo y anís (7,5 mg/kg MS o 0,22 mg/L) arrojaron cambios en los perfiles de AGCC durante los primeros 6 días de adaptación microbiana pero posterior a esto, no se reportaron efectos de los AE en los AGCC. Así mismo en otro estudio realizado por Busquet et al. (2005) se evidenció que los efectos del AE de ajo a baja concentración *in vitro* en un cultivo discontinuo con una duración de 24 horas redujo la concentración total de AGCC a 300 mg/L y posterior a esto no se reportaron efectos del aceite de ajo sobre los AGCC en dosis altas de hasta 312 mg/L.

Tabla 3. Efecto de los A.E a dosis de 0, 0,3, 3 y 30 mg / L y pH de 7,0 Y 5,5 sobre la relación acetato-propionato

Item	pH 7.0				pH 5.5				$\sigma$	P <		
	0	0.3	3	30	0	0.3	3	30		pH	Dosis	pH x Dosis
ATL	2.0	2.3	2.0	2.0	1.4	1.8	1.8	1.6	0.75	0.01	0.01	0.31
EUG	2.0	2.4	2.4	2.5	1.4	1.8	1.8	1.9	0.78	0.01	0.01	0.96
ANI	2.4 <sup>y</sup>	3.2 <sup>z</sup>	3.3 <sup>z</sup>	3.2 <sup>z</sup>	1.6	1.5	1.2	1.2 <sup>v</sup>	0.51	0.01	0.01	0.01
ORE	2.4 <sup>y</sup>	3.0 <sup>z</sup>	3.3 <sup>z</sup>	2.1 <sup>y</sup>	1.6 <sup>u</sup>	1.4 <sup>uv</sup>	1.4 <sup>uv</sup>	1.2	0.17	0.01	0.01	0.01
CIN	1.4 <sup>y</sup>	1.7 <sup>z</sup>	1.6 <sup>z</sup>	1.6 <sup>z</sup>	1.2	1.2	1.2	1.3 <sup>v</sup>	0.05	0.01	0.01	0.01
GAR	1.4 <sup>zy</sup>	1.5 <sup>z</sup>	1.4 <sup>xy</sup>	1.3 <sup>y</sup>	1.2 <sup>u</sup>	1.2 <sup>u</sup>	1.2 <sup>u</sup>	1.1 <sup>v</sup>	0.05	0.01	0.01	0.01
CAP	1.5 <sup>x</sup>	1.9 <sup>y</sup>	1.9 <sup>y</sup>	2.3 <sup>z</sup>	1.3 <sup>u</sup>	1.2 <sup>uv</sup>	0.9 <sup>v</sup>	0.8 <sup>v</sup>	0.04	0.01	0.01	0.01
CDH	1.5 <sup>y</sup>	1.7 <sup>zy</sup>	1.9 <sup>z</sup>	1.8 <sup>z</sup>	1.3 <sup>u</sup>	1.1 <sup>uv</sup>	1.0 <sup>vw</sup>	0.9 <sup>w</sup>	0.07	0.01	0.01	0.01
YUC	1.6 <sup>zy</sup>	1.4 <sup>y</sup>	1.9 <sup>z</sup>	1.5 <sup>zy</sup>	1.3 <sup>u</sup>	0.8 <sup>v</sup>	0.7 <sup>v</sup>	0.7 <sup>v</sup>	0.06	0.01	0.01	0.01

Tratamientos: ATL = anetol, EUG = eugenol, ANI = anís, ORE = oregano, CIN = canela, GAR = ajo, CAP = pimienta, CDH = cinamaldehído, YUC = yuca,  $\sigma$  = desviación estándar.

<sup>u,v,w</sup> Los valores dentro de una fila a pH 5,5 seguido de diferentes superíndices difieren, P <0,05.

<sup>x,y,z</sup> Los valores dentro de una fila a pH 7,0 seguido por diferentes superíndices difieren, P <0,05.

(Fuente: adaptado de Cardozo et al. 2005).

### 2.7.4 Efecto de los aceites esenciales sobre el pH ruminal

El efecto de los aceites esenciales puede ser modulado por el pH ruminal. Alimentos ricos en carbohidratos rápidamente fermentables son más propensos a disminuir el pH ruminal, siendo que esta disminución en el pH podría aumentar el efecto o modo de acción de los aceites esenciales. Esto ocurre porque los aceites deben ser disociados a fin de interactuar con los lípidos de la membrana celular, un hecho que se produce por el aumento de la acidez del medio (Calsamiglia et al., 2007). Spanghero et. al., (2008) observaron cambios en los efectos de una mezcla de aceites esenciales de acuerdo con el pH del medio de incubación (7,0 vs 5,5) con los efectos más pronunciados en pH ácido. En general, los estudios in vivo no muestran un efecto significativo con la adición de aceites esenciales sobre el pH ruminal. Por otro lado, se observó una disminución en el pH en la implementación de una dieta alta en

concentrado aumentando la osmolaridad hasta a 400 mOsm/L en el momento de ingerir los alimentos y una mayor producción de los AGCC (Relling y Mattioli, 2003). “El parámetro normal de osmolaridad puede verse afectado o alterado por la ingestión de concentrados, lo que indica que con una alta osmolaridad se inhibe la digestión de almidón y fibra, por la inhibición de los microorganismos ruminales” (Van Lier y Regueiro, 2008).

“Aparentemente los aceites esenciales no cambian o no tienen un efecto directo en el pH ruminal” (Castillejos et al, 2008), aunque efecto de los aceites esenciales puede ser articulado por el pH ruminal. Esto se debe a que a un pH ligeramente ácido provoca que los aceites esenciales se encuentren en un estado no disociado y por lo tanto en forma hidrofóbica. Las bacterias parecen ser más susceptibles a los efectos de los aceites esenciales a bajo pH lo cual les permite interactuar de forma más fácil con las membranas microbianas y por tanto modificar la población ruminal, la proporción y producción de AGCC (Skandamis y Nychas, 2000).

### **2.7.5 Efecto de los aceites esenciales sobre los microorganismos del rumen**

“El efecto de los aceites esenciales sobre el número de protozoos en el rumen indica que sólo dosis muy grandes de AE pueden reducir el número de protozoos” Hart et al. (2008), “en experimentos realizados con bovinos de leche a los que se les incluyó en la ración alimenticia diaria una mezcla de aceites esenciales con dosis de 110 y 750 mg/d, no observaron cambios en la población de protozoarios” (Benchaar et al., 2007b). Otros estudios realizados han reportado que la alimentación con 200 g/kg de MS de menta (*Mentha piperita*) en novillos Holstein disminuyó el número total de protozoarios y específicamente el número de protozoarios del genero *Entodinium*, *Isotricha* y *Diplodinium*. También se ha observado que el aceite de clavo decrece el número total de protozoarios, afectando a las especies de menor tamaño como *Entodinium* y *Holotrichos*, pero no a los *Entodinium* de mayor tamaño (Patra et al., 2010).

En otros estudios realizados por Yang et al. (2010) “se observó que el cinamaldehído a dosis de 0.4 a 1.6 g/día en novillos de carne no afectó el total de protozoarios pero sí a los protozoarios del genero *Isotricha*, *Dasitricha* y *Entodinium*”. Además la inclusión de 1 g/día de anetol en 2 g de extracto de anís en novillos de carne reveló una disminución en el conteo de *Holotrichos* y *Entodinomorfos* (Cardozo et al., 2006). Según Ando et. al., (2003), “encontraron que la adición de menta en bovinos productores de leche 200 g/día logró reducir el total de protozoarios”.

Por otra parte estudios realizados con AE por Ando et al. (2003) “informaron que la alimentación con 200 g/día (30 g/kg de materia seca) de menta (*Mentha piperita*) a novillos Holstein revelaron una disminución en el número total de protozoos específicamente del genero *Entodinium*, *Isotricha* y *diplo-dinium*”, por otra parte Benchaar et al. (2007c) “reportaron que los recuentos de protozoarios ruminales en vacas lecheras no se vieron afectados por adicionar 750 mg/día de una mezcla de AE”. En otras investigaciones realizadas por Cardozo et al. (2006), observaron que la adición de una mezcla de cinamaldehído (180 mg/día) y eugenol (90mg/día) en dietas de novillas de carne reveló un incremento en el número de Holotricos y ningún efecto en los Entodinomorfos, así mismo reportaron que no hubo ningún efecto sobre el número de estas especies de protozoos cuando la mezcla contenía concentraciones superiores de cinamaldehído (600 mg/día) y eugenol (300 mg/día). Así mismo, reportaron que al adicionar 100 g/kg de anetol a vacas de carne observaron una disminución en el recuento de Holotricos y Entodinomorfos.

#### **2.7.6 Efecto de los aceites esenciales como estrategia de mitigación de las emisiones de metano**

Los principales efectos de la inclusión de aceites esenciales en las dietas como estrategia de mitigación de las emisiones de CH<sub>4</sub> hacia la atmosfera se pueden evidenciar en sus propiedades antimicrobianas, logrando la inhibición de la metanogénesis al interactuar con

los microorganismos ruminales (Dean y Ritchie, 1987). “Los aceites esenciales inhiben tanto microorganismos metanógenos como fermentadores de aminoácidos” (Eschenlauer et al., 2002). “Existen numerosos aceites esenciales y extractos de plantas siendo estos metabolitos secundarios, cada uno con diferentes efectos sobre la fermentación ruminal” (Kamra et al., 2005). La forma en la que actúan los aceites esenciales, parte de su composición química como los terpenoides y compuestos fenólicos, con una fuerte actividad antimicrobiana, debido a su naturaleza lipofílica que presenta una alta afinidad por las membranas celulares microbianas manteniendo así una interacción lipídica (Jouany y Morgavi, 2007), a su vez, “genera una perturbación de estas membranas, alterando el transporte activo de flujo de electrones y la coagulación del contenido celular” (Burt, 2004). La implementación de los aceites esenciales en las dietas como estrategia para reducir la metanogénesis tiene como objetivo mejorar el aprovechamiento de los nutrientes y así mismo, reducir la producción de CH<sub>4</sub>. Por esta razón, es de vital importancia realizar investigaciones exhaustivas con el fin de desarrollar nuevos productos de aceites esenciales naturales como aditivos para en la alimentación de bovinos (Wallace, 2004), “ya que dichos aditivos tienen la capacidad de manipular la fermentación entérica y de esta forma reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> por parte de los bovinos” (Wallace et al. 2002). “Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han evidenciado a través de pruebas in vitro e in vivo para inhibir una serie de bacterias y controlar de esta forma los gases producidos en la fermentación” (Broudiscou et al. 2000), principalmente la producción de CH<sub>4</sub>. En investigaciones realizadas por Lee y Ha (2002) se demostró que el efecto de la adición de 0,1 y 10% de aceite esencial a 0,5 g de Festuca que es un género de gramínea y una adición de concentrado según la proporción de 2:8 o 8:2 se examinó la producción de gas in vitro y la fermentación, demostrando que la suplementación a 10% de aceite esencial incrementó el pH ruminal disminuyendo el nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), la concentración de AGCC y la producción de CH<sub>4</sub> acumulado



a lo largo de 48 h de incubación, cuando se comparó con los niveles a 1% se evidenció que no hubo ningún efecto sobre la producción de CH<sub>4</sub> después de la adición de aceite esencial. Por otra parte, estudios realizados por Broudiscou et al. (2000), demostraron que la metanogénesis se vio afectada, disminuyendo su producción en un 8,2% con *Salvia officinalis* y un 14,2% con *Equisetum arvense* siendo esta planta la de mayor impacto reductor de la metanogénesis. Así mismo, la metanogénesis aumentó en un 13,7% con *officinalis Lavandula* y 7,7% con *Solidago virgaurea*, mostrando así las diferentes formas en las que pueden llegar a actuar los extractos de las plantas en forma de aceites esenciales, conforme lo muestra la Tabla 4. En otros estudios realizados por Benchaar y Greathead (2011) “se concluyó que algunos aceites esenciales derivados del ajo y la canela, reducen la producción de CH<sub>4</sub> in vitro”. Por otro lado, Hristov et al, (2013) en un estudio realizado in vivo en vacas lecheras con *Origanum vulgare* (OV), señaló que el tratamiento control sin adición de AE de OV, comparado con tres tratamiento tratamientos con inclusión de 250, 500 y 750 g/día por animal de AE de OV , reportaron que hubo una disminución en la concentración de amoníaco y una disminución en la producción de metano por unidad de consumo de materia seca a medida que aumentaron la dosis de AE, evidenciando de esta forma, que en el tratamiento control sin adición de AE se produjo 18,2 g de metano / kg MS consumida mientras que en el tercer tratamiento se produjeron 13,6 g de metano /kg de MS consumida. Por lo que este tipo de suplementación con AE de OV tuvo un efecto positivo en la mitigación de CH<sub>4</sub> aumentando de igual forma la eficiencia alimenticia en vacas lecheras como su producción láctea.

Tabla 4. Efecto de los A.E en la producción de gases, principalmente el metano

	Volumen (L por día)	CO <sub>2</sub> (mmol por día)	CH <sub>4</sub> (mol 100 mol <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> (mol 100 mol <sup>-1</sup> )	CO <sub>2</sub> (mol 100 mol <sup>-1</sup> )	CH <sub>4</sub> (mol 100 mol <sup>-1</sup> )	H <sub>2</sub> (mol 100 mol <sup>-1</sup> )
R <sup>2</sup>	0.63	0.63	0.68	0.85	0.78	0.069	0.82
DER	0.88	36.2	10.6	0.202	22.5	8.05	0.343
	Coeficientes						
Tratamientos	5.43	176.4	37.1	0.70	204.4	42.9	0.83
<i>A. millefolium</i>	-0.07	-4.9	-0.5	0.02	-3.7	-0.2	0.04
<i>A. chamissonis</i>	0.14	7.9	2.1	0.02	5.5	1.6	0.02
<i>B. alba</i>	0.06	3.6	1.3	-0.05 <sup>a</sup>	1.3	1.0	-0.08
<i>D. glomerata</i>	0.10	1.8	0.3	0.05	6.2	1.2	0.10
<i>E. globulus</i>	-0.07	-2.3	-0.8	0.01	-6.8	-1.7	-0.04
<i>G. biloba</i>	-0.07	-4.6	-1.4	0.03	-6.3	-1.8	0.05
<i>L. officinalis</i>	0.25	10.1	2.5	-0.15 <sup>b,*</sup>	2.4	0.9	-0.22 <sup>a,*</sup>
<i>L. capitata</i>	0.11	3.3	1.0	0.03	4.8	1.3	0.06
<i>H. perforatum</i>	-0.07	-1.2	-0.6	0.00	-1.1	-0.7	0.01
<i>E. arvense</i>	-0.23	-9.0	-2.6	0.09 <sup>a</sup>	-8.8 <sup>a</sup>	-2.7 <sup>a</sup>	0.12
<i>Propolis</i>	0.11	3.7	0.3	-0.02	-0.5	-0.6	-0.06
<i>F. esculentum</i>	-0.11	-3.8	-0.9	0.06	-3.5	-1.0	0.08
<i>S. officinalis</i>	-0.11	-5.0	-1.5	0.02	-6.2	-1.8	0.01
<i>S. virgaurea</i>	0.18	6.6	1.4	0.01	1.4	0.3	-0.04

DER = desviación estándar relativa; R<sup>2</sup> = coeficiente de determinación.

<sup>a</sup>El factor se identifica como activo usando aproximaciones bayesianas normales y semi-normales.

<sup>b</sup>El factor se identifica como activo usando aproximaciones bayesianas normales y semi-normales.

\* P < 0.10 (hipótesis nula).

(Fuente: adaptado de Broudiscou et al. (2000).

### 2.7.7 Efecto de los aceites esenciales sobre el metabolismo proteico

La proteína microbiana, que fluye del rumen al intestino delgado, aporta al rumiante una excelente fuente de AA para así sintetizar proteínas de la leche y carne, sin embargo la proteína microbiana producida en el rumen no es suficiente para soportar los requerimientos de AA de los rumiantes de alta producción, por lo que la dieta suele complementarse con fuentes de proteína provenientes de los alimentos destinados para este fin, incrementando los costos de producción, sumado a esto se encuentra la pérdida en la utilización del nitrógeno (N), excretando así al medio ambiente residuos ricos en N (Benchaar et al. 2007b), “por lo que es indispensable mejorar la utilización del N incrementando el rendimiento y obteniendo una mejor eficiencia en el proceso productivo e impactar de forma positiva el medio ambiente”.

En una investigación realizada por Borchers (1965) se evidenció que al adicionar timol al líquido ruminal (1g/L) resultó en una acumulación de AA y una disminución en la

concentración del nitrógeno amoniacal ( $N-NH_3$ ), lo que indica una inhibición de la desaminación de AA por parte de las bacterias ruminales. De igual forma, otros estudios realizados por Broderick y Baltrhop (1979) también “reportan que el timol inhibe la desaminación de AA”. En otra investigación realizada por McIntosh et al. (2003) se observó una reducción del 9% en la tasa de desaminación de AA cuando un hidrolizado de caseína se incubó in vitro durante 48h en cultivos discontinuos de fluido ruminal tomado de vacas alimentadas con una dieta a base de ensilaje y suplementadas con 1g/día de una mezcla comercial de compuestos de AE. En otro estudio realizado por Newbold et al. (2004) se evidencia una reducción del 24% en la tasa de desaminación in-vitro cuando el hidrolizado ácido de caseína se incubó durante 24 horas con fluido ruminal colectado de animales alimentados con dietas que contenían 110 mg de mezcla de AE. En el estudio realizado por McIntosh et al. (2003) se evidenció que las especies bacterianas afectadas por una mezcla de AE eran las mismas que inhibía la monensina. Adicional a esto, reportó una reducción en la tasa de desaminación. En este mismo estudio se reportó que una mezcla de AE inhibía el crecimiento de algunos microorganismos específicos e hiperproductores de amoniaco como el *Clostridium sticklandii* y *peptostreptococcus anaerobius*, pero así mismo, se evidenció que otros microorganismos como el *Clostridium aminophilum* eran menos sensibles a la mezcla de AE. Estos microorganismos hiperproductores de amoniaco se encuentran presentes en el rumen en pequeñas proporciones sin embargo poseen una actividad muy alta de desaminación (Russell et al. 1988). Esto sugiere, según Wallace (2004) que los efectos de los AE en el metabolismo de las proteínas en el rumen se encuentra en la degradación de AA y que estos efectos se deben a la inhibición de las bacterias hiperproductoras de amoniaco.

Por otra parte, en un estudio realizado por Castillejos et al. (2005) reportaron que la adición de 1,5 mg/L no logró ningún efecto sobre la concentración de  $N-NH_3$ , la degradación de proteína bruta y la síntesis de proteína microbiana, por lo que sugiere que la dosis de la

mezcla de aceites esenciales fueron demasiado bajas para alterar la actividad de las bacterias ruminales. En otro estudio realizado por Newbold et al. (2006), se evidenció que era necesario adicionar concentraciones altas de una mezcla de aceite esencial mayor a los 35 mg/L para alterar significativamente el metabolismo del N en el rumen, pero estas concentraciones altas de AE pueden ser difíciles de lograr in vivo. En esta misma investigación se reveló que la adición de una mezcla de AE en dosis de 0.75 o 2 g/día no lograron ningún cambio en la concentración ruminal de N-NH<sub>3</sub>, ni en la retención de nitrógeno ni en la digestibilidad del mismo.

En otras investigaciones, Busquet et al. (2005) evidenciaron que la adición de AE de clavo (*Syzygium aromaticum*) en un fermentador de cultivo continuo a 2,2 mg/L redujo significativamente la concentración de péptidos alrededor del 80% pero no se observaron efectos en la concentración de N-NH<sub>3</sub>, lo que sugiere que el AE del clavo redujo la actividad peptidolítica de las bacterias ruminales. El componente principal del AE del clavo es el eugenol y al adicionarlo a la misma concentración no se obtuvo ningún efecto sobre el metabolismo del N, por lo que esto indicaría que la actividad antipeptidolítica del AE del clavo no se debe a su componente principal, si no a otros compuestos no identificados. Por otra parte Busquet et al. (2006) indicaron que al suministrar AE tanto de orégano como de su componente principal el carvacrol a la misma concentración de 3000 mg/L se obtuvo una reducción en la concentración de N-NH<sub>3</sub> in vitro, lo que indicaría que la mayoría de la actividad antimicrobiana del orégano se debe al carvacol. En investigaciones realizadas por Castillejos et al. (2006), se evidenció que la composición química de los AE afecta la forma en la que se altera el metabolismo del N ruminal, ya que se observó una variación de los efectos según el aumento de los niveles de dosificación a 5, 50, 500 y 5000 mg/L de diferentes compuestos de AE durante 24 horas en cultivos in vitro de fluido ruminal, dentro de los compuestos utilizados se obtuvo que el aldehído vanílico (vainillina) fue ineficaz en la

alteración de la concentración de  $N-NH_3$  a dosis de 5, 50 y 500 mg/L, por otro lado el limoneno (monoterpeno) redujo la concentración de  $N-NH_3$  a dosis de 500 mg/L, así mismo se evidenció que el eugenol (fenólico) redujo la concentración de  $N-NH_3$  a dosis de 5, 50, 500 mg/L, mientras que al adicionar el guayacol (fenólico) se obtuvo una disminución de la concentración de  $N-NH_3$  en todas las dosis, en este estudio se logró concluir que los efectos de los componentes de los AE sobre el metabolismo del N varían de acuerdo con su estructura química y concentración, generalmente los compuestos fenólicos por la presencia de los grupos hidroxilo presentan una alta actividad antimicrobiana.

Por otra parte los protozoos ruminales impactan de forma negativa la utilización del N por los rumiantes ya que digieren un gran número de bacterias presentes en el líquido ruminal, disminuyendo así el flujo de proteína microbiana desde el rumen hasta el duodeno, y así mismo los protozoos poseen actividades proteolíticas y de desaminación (Iván et al., 2000; Williams y Coleman, 1992) por lo que la defaunación de protozoos en el rumen evita el reciclado del N entre bacterias y protozoos traduciéndose en un incremento del flujo de N microbiano del rumen. En un estudio realizado en ovejas por Ivan et al. (1992) se determinó que el flujo de proteína bacteriana en el intestino de ovejas defaunadas fue 35% más alto que el flujo de proteína microbiana en ovejas sin defaunación. El incremento en la síntesis de proteína bacteriana en el rumen debido a la defaunación de los protozoarios lograría beneficiar al rumiante mediante el suministro adicional de aminoácidos para su posterior absorción en el intestino, sin embargo pocos son los estudios que se han realizado para observar el efecto de los AE en los protozoarios.

## CONCLUSIONES

La reducción en el consumo de materia seca evidenciada en algunos estudios, puede atribuirse a problemas en la palatabilidad, sin embargo, otros estudios demuestran que al adicionar aceites esenciales en la dieta de rumiantes resulta en un aumento del consumo de materia seca. Por otro lado, cabe indicar que los aceites esenciales tienen muy poco efecto sobre la digestibilidad de la materia seca y sus fracciones, de acuerdo a esto, cabe concluir que los efectos generados por los aceites esenciales sobre estos parámetros son dependientes del tipo de aceite utilizado, su concentración, el tipo de alimento suministrado en las diferentes dietas, así como la relación entre forraje y concentrado en la dieta de bovinos.

El efecto de los AE sobre parámetros de cinética ruminal, como la degradabilidad y tasa de pasaje de la materia seca, revelan resultados muy contradictorios lo que indica que más estudios deben ser realizados, con dosis más altas a las ya estudiadas.

Los efectos de la adición de los AE sobre los parámetros de fermentación ruminal son diversos, dichos efectos sobre los AGCC dependen de la composición de la dieta junto con el tipo de AE. Por otra parte, los efectos de los AE en el perfil de AGCC se encuentran ligados al pH del rumen, incrementando la relación acetato:propionato a pH neutro, o disminuyendo esta relación a un pH ácido de 5,5. Así mismo, en la presente monografía se evidenció que los microorganismos parecen ser capaces de adaptarse a las concentraciones bajas de AE lo que indica un desafío para la aplicación de esta tecnología. Por otra parte el efecto de los AE sobre algunos microorganismos del rumen como son los protozoos son muy variados reportando que dosis bajas de AE entre 0.4 y 1.6 g/día no afecta el total de los protozoos pero si a los del genero *Isotrica*, *Dasitrica* y *Entodinium*.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allen, M. S.; Mertens, D. R. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *J. Anim. Sci.* 118: 261-270.
- Ando, S.; Nishida T.; Ishida, M.; Hosoda, K.; Bayaru, E. (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livest Prod Sci.*, 82:245-248.
- Avila, F.; Soares, L. (2007). Estudio de la composición química de los aceites esenciales de plantas aromáticas de la amazonia. Instituto de química. Universidad estatal de Campinas.
- Bajpai, V.K.; Rahman, A.; Sun C.K. (2008). Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 125(2):117-122.
- Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2007). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol.* 46(2):446-75.
- Barker, H.A. (1961). *The bacteria*. 1ª Edición. Academic press. New York. 2:151.
- Baser, K. H.; Buchbauer, G. (2010). *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications* / K. Hüsnü Can Baser, Gerhard Buchbauer. Universitat Wien, Austria.
- Bath, H.; Rook, J. A. F. (1965). The evaluation of the cattle foods and diets in terms of the ruminal concentration of volatile fatty acids. II. Roughages and succulents. *J. Agr.* 64:67-75.
- Beauchemin, K.A.; McGinn, S.M. (2006). Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84:1489–1496.
- Beauchemin K.A.; McGinn, S.M.; McAllister, T.A. (2009). Dietary mitigation of enteric methane from cattle *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 4:1-18.

- Beever, D.E.; Camrnell, S.B.; Sutton, J.D.; Spooner, M.C.; Haines, M.J.; Harland, J.I. (1989). The effect of concentrate type on energy utilization in lactating cows. Proc. 11th Symp. on Energy Metabolism EAAP Publication No. 43:33.
- Betts, T.J., (2001). Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. J. Chromatogr. 936:33–46.
- Belanche, A.; de la Fuente, G.; Pinloche, E.; Newbold, C.J.; Balcells, J. (2012). Effect of diet and absence of protozoa on the rumen microbial community and on the representativeness of bacterial fractions used in the determination of microbial protein synthesis. J.Anim.Sci. 90:3924–3936.
- Benchaar, C.; Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Anim. Feed Sci. Technol. 166–167:338–355.
- Benchaar, C.; McAllister, T.A.; Chouinard, P.Y. (2008). Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. J. Dairy Sci. 91:4765–4777.
- Benchaar, C.; Calsamiglia, S.; Chaves, A.V.; Fraser, G.R.; Colombatto D.; McAllister, T.A.; Beauchemin, K.A. (2007a). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. J Dairy Sci. 145:209–228.
- Benchaar, C.; Petit, H.V.; Berthiaume, R.; Ouellet, D.R.; Chiquette, J.; Chouinard, P.Y. (2007b). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. J. Dairy Sci. 90:886–897.



- Benchaar, C.; Chaves, AV.; Fraser, GR.; Yang Y.; Beauchemin KA.; McAllister TA. (2007c) Effects of essential oils and their components on In vitro rumen microbial fermentation. *Can Journal of animal science* 87:413-419.
- Benchaar, C.; Petit, H.V.; Berthiaume, R.; Whyte, T.D.; Chouinard. P.Y. (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:4352–4364.
- Benchaar, C; Petit., H.V.; Berthiaume, R.; Ouellet, D.R; Chiquette, J. (2003). Effects of essential oil supplement on ruminal fermentation, rumen microbial populations and in sacco degradation of dry matter and nitrogen in the rumen of lactating dairy cows. *Can J Anim Sci*, 83:637.
- Bondi, A. A. (1989). *Nutrición Animal*. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España. 546 pp.
- Borchers, R. (1965). Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 24:1033–1038.
- Bowles, E.J., (2003). *Chemistry of Aromatherapeutic Oils*. Allen & Unwin. Edicion N° 3. National Library of Australia. 256 pp
- Broderick, G.A.; Balthrop, J.E. (1979). Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 49:1101–1111.
- Broudiscou, L.P; Papon, Y.; Broudiscou, A.F. (2000). Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci.Technol.* 87:263–277.
- Burns, J.C. (2008). Centennial Paper: utilization of pasture and forages by ruminants: a historical perspective. *J Anim Sci* 86:3647-3663.
- Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food. Microbiol.* 94:223-253.

- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Cardozo, P.W.; Kamel, C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88:2508–2516.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:597–613.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2006). Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761–771.
- Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P.W.; Castillejos, L.; Ferret, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.*, 90: 2580 – 2595.
- Cardozo, P.W.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82: 3230–3236.
- Cardozo, P.W.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high concentrate diet for beef cattle. 83(11):2572-2579.
- Cardozo, P.W.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *Journal animal science.* (84):2801-2808.
- Carmona, J. C.; Bolivar, D, M.; Giraldo, L. A. (2005). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias.* 18(1):49-63.

- Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. (2006). Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *J. Dairy. Sci.* 89:2649–2658.
- Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Losa, R. (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119: 29–41.
- Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Martín-tereso, J.; Ter wijlen, H. (2008). In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology.* 145:259-270.
- Cerrato, S.M.; Calsamiglia, S. (2003). Acidosis ruminal y estrategias de prevención en vacuno lechero. In: VIII congreso internacional de medicina Bovina. Bellaterra, España. Ediciones técnicas reunidas.
- Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; Bruyne, T.; Hermans, N. et al. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 79:213–220.
- Cox, S. D.; Mann, C.M.; Markam. J.L. (2001). Interaction between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J. Appl. Microbiol.* 91:492–497.
- Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G., (2000). Natural products (secondary metabolites) Chapter 24. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Dean, S.G.; G. Ritchie. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 5:165–180.

- Demment, M.W.; Van soest, P.J. (1982). Bodysize, digestive capacity and feeding strategies of herbivores. Winrock International Livestock Research and Training Center, Petit Jean Mountain, Morrilton, Ark. 66pp.
- Dilorenzo, N. (2011). Manipulation of the Rumen Microbial Environment to Improve Performance of Beef Cattle. Fuente: <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2011/11diLorenzo.pdf>. Fecha de Consulta: febrero de 2015.
- Doreau, M.; Ferlay, A. (1995). Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: a review. *Livest.Prod.Sci.* 43:97–110.
- Ellis, W.C.; Matis, J.H.; Pond, K.R. (1984). Dietary influences on flow rate and digestive capacity. In: Gilchrist, F.M.C., Mackie, R.I. (Eds.). *Herbivore nutrition in the subtropics and tropics*. Pretoria: Science Press. p.269-293.
- Eschenlauer, S.C.P.; McKain, N.; Walker, N.D.; McEwan, N.R.; Newbold, C.J.; Wallace, R.J. (2002). Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:4925–4931.
- Eun, J.S.; Fellner, V.; Gumpertz, M.L. (2004). Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dualflow fermentors. *Journal of Dairy Science.* 87: 112-121.
- Forrest, W.W.; Walker, D.J. (1971). *Advances in microbial Physiology* 1a Edicion. 213-274pp.
- Greathead H. (2003). Plant and plant extract for improving animal productivity. In: *Proc. Nutr. Soc.*,62, p.279-290.
- Griffin, S.G.; Wyllie, S.G.; Markham, J.L.; Leach, D.N. (1999). The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour Fragr. J.* 14:322–332.

- Grudsky P.; Roberto, J.; Arias B. (1983). Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías de Medicina Veterinaria. Laboratorio Biología Celular. Patología Veterinaria. Facultad Ciencias Agrarias, Veterinarias y Forestales. Universidad de Chile. Vol. 5(2)
- Gustafson, R.H.; Bowen, R.E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 83:531–541.
- Guyader, J.; Eugene, M.; Noziere, P.; Morgavi, D.P.; Doreau, M.; Martin, C. (2014). Influence of rumen protozoa on methane emission in ruminants: a meta-analysis approach. *Animal.* 8:1816–1825.
- Haro, J.M. (2002). Consumo Voluntario de Forraje por Rumiantes en Pastoreo. *Acta Universitaria.* Vol. 12. Edición N° 3. Universidad de Guanajuato, México: 56-63 pp.
- Harrewijn, P.; Van Oosten, A.M.; Piron, P.G.M. (2001). *Natural Terpenoids as Messengers.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 440 pp.
- Hart, K.J.; Yanez-Ruiz, D.R.; Duval, S.M.; McEwan, N.R.; Newbold. C.J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science Technology.* 147:8–35.
- Hegarty, R. (2001). Greenhouse gas emissions from the Australian livestock sector what do we know, what can we do? Canberra: NSW Agriculture Australian Greenhouse Office. 35 pp.
- Helander, I. M.; Alakomi, H.; Latva-Kala, K.; Mattila-Sandholm, T.; Pol, I.; Smid, E. J.; Gorris, L.G.M.; Wright. A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46:3590–3595.
- Hobson, P. N.; Wallace, R. J.; Marvin P. (1982). Microbial ecology and activities in the rumen: Part I and Part II. *CRC Critical Reviews in Microbiology.* 225 pp.

- Horadagoda, A.; Fulkerson, W. J.; Barchia, I.; Dobos, R. C.; Nandra, K. S. (2008). The effect of grain species, processing and time of feeding on the efficiency of feed utilization and microbial protein synthesis in sheep. *Livest. Sci.* 114:117-126.
- Hristov, A.N., Jouany, J.P. (2005). "Factors affecting the efficiency of nitrogen utilization in the rumen," in *Nitrogen and Phosphorus Nutrition of Cattle and Environment*, ds A. N. Hristov and E. Pfeffer (Wallingford: CAB International). 177–166.
- Hristov, A.N.; Lee, C.; Cassidy, T.; Heyler, K.; Tekippe, J.A.; Varga, G.A.; Corl, B.; Brandt, R.C. (2013). Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on production and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:1189-1202.
- Huhtanen, P.; Kukkonen U. (1994). Comparison of methods, markers, sampling sites and models for estimating digesta passage kinetics in cattle fed at two levels of intake. *Animal Feed Science Technology.* 52:141-158.
- Huntington, G.B. (1997). Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *Journal of Animal Science.* 75:852-867.
- Huws, S. A.; Kim, E.J.; Kingston-Smith, A.H.; Lee, M.R.F.; Muetzel, S.M.; Cookson, A.R. et al. (2009). Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69:461–471.
- Huws, S.A.; Lee, M.R.F.; Kingston-Smith, A.H.; Kim, E.J.; Scott, M.B.; Tweed, J.K.S. et al. (2012). Ruminant protozoal contribution to the duodenal flow of fatty acids following feeding of steers on forages differing in chloroplast content. *Br. J.Nutr.* 108:2207–2214.
- Hvelplund, T.; Weisbjerg, M.R. (2000). In Situ techniques for the estimation of protein degradability and post-ruminal availability. In: Givens, D. I., Owen, E., Axford, R.F.E. and Omed H.M. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition.* CAB International. p. 233-257.

- Ivan, M. (2009). Comparison of duodenal flow and digestibility in fauna-free sheep inoculated with Holotrich protozoa, Entodinium monofauna or total mixed protozoa population. *Br.J.Nutr.* 101: 34–40.
- Ivan, M.; Dayrell, M.D.; Mahadevan, S.; Hidiroglou, M. (1992). Effect of bentonite on wool growth and nitrogen metabolism in fauna-free and faunated sheep. *J. Anim. Sci.* 70:3194–3202.
- Ivan, M.; Neill, L.; Forster, R.; Alimon, R.; Rode, L.M., Entz, T. (2000). Effects of *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, and total fauna on ruminal fermentation and duodenal flow in wethers fed different diets. *J. Dairy Sci.* 83:776–787.
- Johnson, K. A.; Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73(8):2483-2492.
- Jouany, J.P.; Morgavi, D.P. (2007). Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*. 1(10):1443–1466.
- Kamra, D. N.; Argarwal, N.; Chaudhary, L. C. (2005). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In: 2nd Int. Conf. Greenhouse Gases Anim. Agric. C. R. Soliva, J. Takahashi, and M. Kreuzer, ed. ETH, Zurich, Switzerland. 102 pp.
- Krause, D.O.; Denman, S.E.; Mackie, R.I.; Morrison, M.; Rae, A.L.; Attwood, G.T.; McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* (27): 663-693.
- Kristensen, E.S; Moller, P.D.; Hvelplund, T. (1982). Estimation of the effective protein degradability in the rumen of cows using the nylon bag technique combined with the outflow rate. *Acta Agr Scand.* 32:123-127.

- Lee, S.Y.; Ha, J.K. (2002). Effects of essential oil on in vitro production and fermentation. Proc. 4th Korea-Japan Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology. Jeju, Korea.
- Leng, R.; Annison, F. (1964). The metabolism of d(-)- $\beta$ -hydroxybutyrate in sheep. *Biochem J.* 90(3):464–469.
- Mackie, R.I.; Gilchrist, F.M.C.; Robberts, A.M.; Hannah, P.E.; Schwartz, H.M. (1978). Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J.Agric.Sci.* 90:241–254.
- McGuffey, R.K.; Richardson, L.F.; Wilkinson, J.I.D. (2001). Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. *J. Dairy Sci.* 84:E194–E203.
- McIntosh, F.M.; Williams, P.; Losa, R.; Wallace, R.J.; Beever, D.A., Newbold, C.J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and environmental microbiology.* 69(8): 5011–5014.
- Merchen, N.R. (1993). Digestion, absorption and excretion in ruminantes In: Church, D.C. (Ed.) *The ruminant animal digestive physiology and nutrition.* 4.ed. Carvallis: O&B Books.
- Metwally. A.; Deml., M.; Fahn., C.; Windisch., W. (2016). Effects of a specific blend of essential oil on rumen degradability, total tract digestibility and fermentation characteristics in rumen fistulated cows. University munich, Germany *Journal of Dairy, veterinary & animal research.* 3: 441-451.
- Meyer, N.; Galen, E.; Klopfenstein, T.; Greenquist, M.; Luebbe, M. (2009). Effect of Essential Oils, Tylosin, and Monensin on Finishing Steer Performance, Carcass Characteristics, Liver Abscesses, Ruminal Fermentation, and Digestibility. *J. Anim. Sci.* 87:2346–2354



- Mohammed, N.; Ajisaka, N.; Lila, Z.A.; Mikuni, K.; Hara, K.; Kanda, S.; Itabashi, H. (2004). Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *J. Anim. Sci.* 82:1839–1846.
- Moore-Colyer, M.J.S.; Marrow, H.J.; Longland, A.C. (2003). Mathematical modelling of digesta passage rate, mean retention time and *in vivo* digestibility of two different lengths of hay and big-bale grass silage in ponies. *Br. J. Nutr.* 90:109– 118.
- Muñoz, C.; Yan, T.; Wills, D.A.; Murray, S.; Gordon, A.W. (2012). Comparison of the Sulphur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 3139 – 3148.
- Nagaraja, T.G.; Newbold, C.J.; Van Nevel, C.J.; Demeyer, D.I. (1997). “Manipulation of ruminal fermentation,” in *The Rumen Microbial Ecosystem*, eds P. N. Hobson and C. S. Stewart (London: Blackie Academic and Professional), 523–632p.
- Newbold, C.J.; Duval, S.M.; McEwan, N.R.; Y´añez-Ruiz, D.R.; Hart, K.J. (2006). New feed additives for ruminants a European perspective. In: *Proceedings of the Pacific Northwest Animal Nutrition Conference and Virtus Nutrition Pre-conference*, Vancouver, BC, Canada. 81–90pp.
- Newbold, C.J.; McIntosh, F.M.; Williams, P.; Losa, R.; Wallace, R.J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci.* 114:105–112.
- NRC, (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, seventh ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Olivera, J.S.; Zanine, A.M.; Santos. E.M. (2007). Microbial diversity in the ecossistema ruminal. Vol VIII.

- Ørskov, E.R.; De Hovell, F.D.; Mould, F. (1980). The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, Scotland. *Trop Anim Prod.* 5(3):195-213.
- Ouattara, B.; Simard, R. E.; Holley, R. A.; Piette, G. J.P.; Begin, A. (1997). Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 37:155–162.
- Owens, F. N.; Goetsch, A. L. (1988). Ruminant fermentation. In: Church, D. C. (Ed). *The ruminant animal: digestive physiology and nutrition.* Waveland Press. 145-171pp.
- Owens F.N.; Hanson F.C. (1992). Symposium: external and internal markers, external and internal markers for appraising site and extent of digestion in ruminants. *Journal of dairy science.* 75(9):2605-2617.
- Owens, F. N.; Zinn, R.A.; Kim, Y.K. (1986). Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *Journal of animal science.* 63:1634-1648.
- Page S.W. (2006). Current use of antimicrobial growth promoters in food animals: The benefits. In *Anti microbial Growth Promoters-Where Do We Go from Here?* Wageningen Academic Publishers, the Netherland.
- Patra, A.K (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminal production. *Asian journal of Animal and Veterinary Advances.* 5:416-428.
- Patra, A.K.; Kamra, D.N.; Agarwal, N. (2010). Effects of extracts of spices on rumen methanogenesis, enzyme activities, and fermentation of feeds in vitro. *J Sci Food Agric.* 90:511–520.
- Pichersky, E.; Noel, J.P.; Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science.* 311:808–811.
- Pierre, J.; Beniamin, H.; Harinder, M. (2013). Mitigation of greenhouse in livestock production. Roma. Italia. Food and agriculture organization of the United Nations. 226 pp.

- Polin, L.; Muro, A.; Díaz, L. (2014). Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes. Revisión. Revista Mexicana de ciencias pecuarias. (1): 25-47.
- Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (2004). Control de microorganismos por agentes físicos y químicos. Microbiología, 5a Ed. McGraw Hill Interamericana de España, S. A. U. 145-162pp.
- Relling, A.E.; Mattioli, G.A. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de ciencias veterinaria. Universidad nacional de la plata. EDULP, 2002 -2003. 72pp.
- Russell, J. B. (2002). Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. Ithaca: J. B. Russell. 119pp.
- Russell, J.B.; Strobel, H.J.; Chen, G. (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *App. Environ. Microbiol.* 54:872–877.
- Samarini, F.; Ribeiro, G.L.; Guimaraes, R.; Ferraz, C.F.; Viera, A. et al. (2011). Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. Embrapa Gado de Leite. Documento 14. Juiz de fora. Brasil.
- Sellers, A. (1955). *Physiology of digestion in the ruminant*. Butterworth, Lonteworth, London, 390.
- Sgoifo, C.L.; Compiani, R.; Baldi, G.; Caprarotta, L. (2012). Essential oils examined for beef cattle rearing. *Feddstuffs*. 84, 3p.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2003). *Farmacognosia da plantaio medicamento*. 5ª edição. Editora da UFSC.
- Sissons, W.; Thurston, M.; Smith, R.H. (1984). Reticular myoelectric activity and turnover of rumen digesta in the growing steer. *Can. Anim. Sci.* 64 (Suppl.): 70-71.

- Skandamis, P.N.; Nychas, G.E. (2000). Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Applied and environmental microbiology*. 66:1646–1653.
- Spanghero, M.; Zanfi, C.; Fabbro, E.; Scicutella, N.; Carnellini, C. (2008). Effects of a blend of essential oil on some end products of *in vitro* rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 145:364-374.
- Tager, L.R.; Krause, K.M. (2010). Effects of cinnamaldehyde, eugenol, and capsicum on fermentation of a corn-based dairy ration in continuous culture. *Can. J. Anim. Sci.* 90:413–420.
- Tager, L.R.; Krause, K.M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:2455–2464.
- Tahir, M. N. (2008). Voluntary feed intake by dairy cattle, Department of Agricultural Research for Northern Sweden. 46p.
- Tarazona, A.M., Ceballos, M.C.; Naranjo, J.F.; Cuartas, C.A. (2012). Factores que afectan el comportamiento de consumo y selectividad de forrajes en rumiantes. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*. 25:473-487.
- Ultee, A.; Kets, E.P.; Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4606–4610.
- Vakili, A., Khorrami, B. (2013). The Effects of Thyme and Cinnamon Essential Oils on Performance, Rumen Fermentation and Blood Metabolites in Holstein Calves Consuming High Concentrate Diet. *Asian-Australas J Anim Sci.* 26(7):935-44.
- Van Lier, E., Regueiro, M. (2008). Digestión en retículo-rumen. Departamento de producción animal y pasturas curso de anatomía y fisiología animal, Uruguay.

- Van Soest, P, J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476 pp.
- Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Proc. Nutr. Soc. 63:621–629.
- Wallace, R.J.; McEwan, N.R.; McIntosh, F.M.; Teferedegne, B.; Newbold, C.J. (2002). Natural products as manipulators of rumen fermentation. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 15:1458–468.
- Wang, C.J.; Wang, S.P.; Zhou, H. (2009). Influences of flavomycin ropadiar an saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation and methane emission from sheep. Anim. Feed Sci. Technol., 148: 257 – 166.
- Wattiaux, M.A.; Armentado, L.E. (1994). Metabolismo de carbohidratos en vacas lecheras. Instituto Babcock para la investigación y desarrollo internacional de la industria lechera.Universidad de Wisconsin-Madison. 10-11pp.
- Wendakoon, C.N.; Sakaguchi, M. (1995). Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. J. Food Prot. 58:280–283.
- Williams, A.G.; Coleman, G.S., (1992). The Rumen Protozoa. Springer-Verlag, New York, USA. 423p.
- Yang, W.Z.; Ametaj, B.N.; Benchaar, C.; Beauchemin, K.A. (2010). Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: Ruminant and intestinal digestion. J Anim Sci. 88:680-8.
- Yáñez-Ruiz, D.R.; Scollan, N.D.; Merry, R.J.; Newbold, C.J. (2006). Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. Br.J.Nutr. 96:861–869.

Zoghbi, M.G.B.; Andrade, E.H.A.; Santos, A.S.; Silva, M.H.L.; Maia, J.G.S. (1998). Volatile constituents of the resins from *Protium suberratum* And *Tetragastris Panamensis*. Kuntz. *Journal of Essential Oil Research*. 10:325-326.