



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**EFFECTO DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ACUOSOS DE  
AJO, CANELA, ROMERO Y EUCALIPTO, EN LA FERMENTACIÓN  
RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

Aarón Alejandro Molho Ortiz

Nº de cuenta: 307197711

Asesores:

Dr. Luis Corona Gochi

Dr. Efrén Ramírez Bribiesca



Ciudad Universitaria, Cd.Mx.

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Dedicatorias:

A mí familia (Aarón, Wendy, Ximena) por apoyarme siempre, en las buenas y en las malas. Por ser mi corazón y mi razón. Por la paciencia, por el amor y por ser mi motor.

A mis abuelos Neftalí, Alejandro, Clara y Marcela por heredarme la locura, la inteligencia, el corazón, la voluntad y el trabajo.

Agradecimientos:

A todo el personal del DNAB, mención especial al Dr. Luis, a la Dra. Claudia. A la Q. Águeda, al Q. Juan Carlos, al Dr Rosiles, Al Dr Atmir, a Meche, a Paulina, a Karen, a Lalo, a Julieta, a Manuel, a Toño y a todos y cada una de las personas que me hicieron sentir en casa en el laboratorio.

A mi familia que nunca me dejó solo, tía Raquel, Tía Fer, Tío Ferchis, Tío Davichón, a mis amigos que siempre me apoyaron a Choby, Tere, Benjy, Leslie, Areli, Dan, Soplo, Malva, Puebla, Olivia, Paco, Betty, Ferchita, Ale Eguiza, Patrick, Liz, Champi, Angie.

A las mujeres que amé y a la que amo hoy, Alejandra Lavín.

Se agradece el financiamiento parcial del proyecto:

PAPIIT-DGAPA-UNAM-IN226216.

## Contenido

Índice de cuadros, y figuras. ....	- 4 -
Índice de cuadros:.....	- 4 -
Índice de figuras:.....	- 5 -
Glosario y definiciones. ....	- 6 -
Resumen: .....	- 9 -
Abstract:.....	- 10 -
1. Introducción.....	- 11 -
2. Revisión de literatura. ....	- 12 -
2.1. Gases de efecto invernadero. ....	- 12 -
2.2. Fermentación ruminal.....	- 17 -
2.2.1. Los carbohidratos.....	- 18 -
2.2.1.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen. ....	- 19 -
2.2.1.2. Ácidos grasos volátiles. ....	- 20 -
2.2.2. Proteínas y nitrógeno a nivel ruminal. ....	- 21 -
2.2.2.1. Fracciones de la proteína. ....	- 22 -
2.2.3. Lípidos en rumen.....	- 24 -
2.2.3.1. Ácidos grasos insaturados en rumen. ....	- 25 -
2.3. Formación de metano en el rumen. ....	- 25 -
3. Estrategias para la reducción de metano. ....	- 27 -
3.1. Selección genética.....	- 27 -
3.2. Químicos.....	- 28 -
3.3. Vacunas. ....	- 28 -
3.4. Inhibidores enzimáticos. ....	- 28 -
3.4.1. 3-Nitrooxypropanol (NOP).....	- 29 -
3.5. Estrategias nutricionales.....	- 30 -
3.5.1. Nitratos.....	- 31 -
3.5.2. Suplementación de lípidos. ....	- 31 -
3.5.3. Adición de ácidos orgánicos.....	- 32 -
3.6. Uso de ionóforos.....	- 32 -
3.7. Fitoquímicos (extractos de plantas). ....	- 33 -
3.7.1. Taninos. ....	- 34 -
3.7.2. Saponinas.....	- 35 -
3.7.2.1. Efectos de las Saponinas. ....	- 36 -
3.7.3. Aceites esenciales.....	- 36 -
3.7.4. Fitoquímicos presentes en el Romero, Eucalipto y Canela.....	- 38 -
3.7.4.1. Terpenos. ....	- 38 -
3.7.4.2. Compuestos fenólicos. ....	- 38 -
3.7.5. Compuestos presentes en la canela.....	- 39 -

3.7.5.1.	Fenilpropanoides. ....	- 39 -
3.7.6.	Compuestos presentes en el Ajo. ....	- 39 -
3.7.6.1.	Organosulfuros: (Tiosulfinato). ....	- 39 -
4.	Sistemas de evaluación de la fermentación ruminal. ....	- 40 -
4.1.	Evaluación de la digestibilidad in situ. ....	- 40 -
4.1.1.	Animales canulados. ....	- 43 -
4.2.	Técnicas de fermentación <i>in vitro</i> . ....	- 43 -
5.	Justificación: .....	- 47 -
6.	EFFECTO DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ACUOSOS DE AJO, CANELA, ROMERO Y EUCALIPTO EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO. ....	- 49 -
7.	Materiales y métodos. ....	- 49 -
7.1.	Lugar de desarrollo de la prueba:.....	- 49 -
7.2.	Diseño experimental y tratamientos .....	- 49 -
7.3.	Fitoquímicos.....	- 50 -
7.4.	Análisis químicos. ....	- 51 -
7.5.	Producción de gas <i>in vitro</i> . ....	- 52 -
7.7.	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y materia orgánica.....	- 55 -
7.8.	Cinética ruminal. ....	- 55 -
8.	Estimación de energía metabolizable (EM), ácidos grasos volátiles (AGV's), producción de masa microbiana. (MM), porcentaje de metano (%CH <sub>4</sub> ) y Mililitros de metano por gramo de materia orgánica fermentada en rumen (mL CH <sub>4</sub> /g MOFR.).....	- 56 -
9.	Resultados.....	- 58 -
10.	Discusión. ....	- 64 -
11.	Conclusiones. ....	- 67 -
12.	Bibliografía general.....	- 68 -

## Índice de cuadros, y figuras.

### Índice de cuadros:

Cuadro 1	Recomendaciones para procedimientos de digestión in situ. ....	- 41 -
Cuadro 2	Recomendaciones generales para técnicas de digestibilidad <i>in vitro</i> . ....	- 46 -
Cuadro 3	Composición nutricional de la dieta experimental (MS) .....	- 58 -
Cuadro 4	Efecto de aceites esenciales (E) y extractos acuosos(A) en la fermentación ruminal, DIVMS e ICAF con la técnica de producción de gas <i>in vitro</i> . ....	- 59 -
Cuadro 5	Efecto de aceites esenciales (A) y extractos acuosos (E) en los parámetros: Energía Metabolizable (EM) Ácidos Grasos Volátiles (AGV's), producción de masa microbiana (MM), % de emisión de Metano (CH <sub>4</sub> %) y mL de Metano/g Materia Orgánica Fermentada en Rumen (CH <sub>4</sub> /g MOFR) .....	- 60 -

## Índice de figuras:

Figura 1 Inventario nacional de emisiones de GEI en México (INECC 2016) .....	- 16 -
Figura 2 Esquema del metabolismo de los carbohidratos en el rumen, modificación por (William y Salazar, 2005). .....	- 21 -
Figura 3 Esquema de fermentación microbiana de los polisacáridos y reducción del H <sub>2</sub> en el rumen, modificado de (Morgavi <i>et al.</i> 2010). .....	- 26 -
Figura 4 Proceso de evaporación utilizando un rotavapor Buchi® para la concentración de los extractos acuosos.....	- 51 -
Figura 5 Ovinos donadores de contenido ruminal.....	- 51 -
Figura 6 Técnica de producción de gas <i>in vitro</i> . .....	- 53 -
Figura 7 Medición de producción de gas. ....	- 53 -
Figura 8 Muestreo para determinación de CH <sub>4</sub> y H <sub>2</sub> . .....	- 54 -
Figura 9.Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos sobre la tasa de fermentación <i>in vitro</i> (mL de gas/500mg M.S).....	- 61 -
Figura 10 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos sobre el volumen de gas acumulado <i>in vitro</i> . (mL de gas/500m g M.S.).....	- 61 -
Figura 11 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en las fracciones de la fermentación (mL de gas/500mg M.S.).....	- 62 -
Figura 12 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la producción de AGV's (mmol/200mg M.S.) .....	- 62 -
Figura 13 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la producción de masa microbiana (mg/g M.S.). .....	- 63 -
Figura 14 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la Energía Metabolizable (Mcal/Kg M.S.) .....	- 63 -
Figura 15 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la emisión de metano / gramo de materia orgánica fermentada en rumen (mL CH <sub>4</sub> /g MOFR).....	- 64 -

## Glosario y definiciones.

- **Acetil CoA** Acetil Coenzima A
- **ADN** Ácido Desoxirribonucleico
- **AGCC** Ácidos grasos de cadena corta
- **AGL** Ácidos Grasos Libres
- **AGV's** Ácidos grasos volátiles
- **ARN** Ácido Ribonucleico
- **ATP** Adenosin trifosfato.
- **BFCE** Bacterias fermentadoras de carbohidratos estructurales
- **BFCNE** Bacterias fermentadoras de carbohidratos no estructurales
- **CH<sub>4</sub>** Metano
- **CMS** Consumo de materia seca
- **CNCPS** Cornell Net Carbohydrate and Protein System
- **CO<sub>2</sub>** Dióxido de carbono
- **DIVMS** Degradación *in vitro* de la materia seca
- **DMS** Digestibilidad de la materia seca
- **DRP** Degradación ruminal de la proteína
- **EM** Energía metabolizable
- **FDA** Fibra detergente ácido
- **FDN** Fibra detergente neutro
- **FDNfe** Fibra Detergente Neutro Físicamente Efectiva
- **FL** Fermentación lenta.
- **FM** Fermentación media
- **FR** Fermentación rápida
- **GEI** Gases de efecto invernadero
- **H<sup>+</sup>** Hidrogeniones
- **HCL** Ácido clorhídrico
- **HMG-CoA** 3- hidroxí-3-metil-glutaril coenzima A (reductasa)
- **ICAF** Índice de contaminación atmosférica por forrajes
- **KOH** Hidróxido de potasio



- **L** Fase de retardo
- **MCR** metil-coenzima M reductasa
- **mM** Milimoles
- **MM** Producción de proteína microbiana
- **MO** Materia orgánica
- **MOFR** Materia orgánica fermentada en rumen
- **MS** Materia seca
- **MSD** Materia seca degradada
- **N<sub>2</sub>O** Óxido nitroso
- **NH<sub>2</sub>** Nitrógeno amino
- **NH<sub>3</sub>** Amoniaco
- **NNP** Nitrógeno no proteico
- **NOP** 3-nitrooxypropanol
- **PDR** Proteína degradable en rumen
- **PM** Proteína microbiana
- **PNDR** Proteína no degradable en rumen
- **RPM** Revoluciones por minuto
- **S** Tasa de fermentación
- **SAD** Sustrato aparentemente degradado.
- **TFIV** Técnicas de fermentación *in vitro*
- **VA** Volumen acumulado
- **VF** Volumen fraccional
- **Vmax** Volumen máximo

**Nutracéuticos:** El término nutracéutico, fue acuñado a partir de las palabras “nutrición” y “farmacéutico” en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice, quién menciona que un nutracéutico puede ser definido como “Un alimento (o parte de él) que provee beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o tratamiento de una enfermedad (Kalra 2003).

**Suplemento dietético:** es un producto destinado a complementar la dieta, en él se contiene uno o más de los siguientes ingredientes: vitaminas, minerales, hierbas u otros productos botánicos, aminoácidos o algún otro producto cuya finalidad es complementar la dieta, aumentando la ingesta diaria de un concentrado, metabolito, constituyente, extracto o combinaciones de estos ingredientes. (Pandey *et al.* 2010).

**Fitoquímicos:** Se refiere a sustancias biológicamente activas presentes en diversos vegetales, estas poseen un efecto en la bioquímica animal y el metabolismo, dichas sustancias se están evaluando por diferentes grupos de investigación en el mundo, ya que, proveen beneficios a la salud. Como los siguientes: 1) Substratos para reacciones bioquímicas, 2) Cofactores para reacciones enzimáticas. 3) Inhibidores de reacciones enzimáticas. 4) Absorbentes / Secuestrantes que ligan y eliminan constituyentes indeseables en intestino. 5) Ligandos (como los presentes en los flavonoides, que actúan como cardioprotectores.) (Dillard y Bruce German 2000).

## Resumen:

El objetivo del estudio fue evaluar ocho fitoquímicos de cuatro especies en dos presentaciones, aceites esenciales (**A**) (Laboratorio Rosa Elena Dueñas <sup>TM</sup>) y extractos acuosos (**E**) de Ajo (**AA, EA**), Canela (**AC, EC**), Eucalipto (**AEU, EEU**) y Romero (**AR, ER**) en la fermentación ruminal mediante la técnica de producción de gas. Tres borregos con cánula ruminal fueron los donadores de líquido ruminal; los fitoquímicos se evaluaron a una dosis de 900 mg / L con una dieta basal (50% de concentrado, 20% de alfalfa y 30% de ensilaje de maíz, base seca). Se evaluó: digestibilidad *in vitro* de materia seca (**DIVMS**), volumen fraccional de carbohidratos fermentados (**VFCF**), volumen máximo de gas (**Vmax**), tasa de producción de gas (**S**), Fase lag (**L**) e índice de contaminación atmosférica por forrajes (**ICAF** =  $(V_{max} / DIVMS) * 100$ ). El metano se determinó indirectamente capturando el gas y disolviendo el CO<sub>2</sub> con solución KOH 1M. Los datos de la prueba se analizaron de acuerdo a un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 2 (presentación) x 4 (especies) más dos controles: dieta basal (T) y 30 ppm de Monensina sódica (**MON**), a través de PROC MIXED de SAS ©. Los efectos de los tratamientos se probaron para los siguientes contrastes: A Vs E, AA Vs EA, AC Vs EC, AEU Vs EEU, AR Vs ER, T Vs A, T Vs E, MON Vs A, MON Vs E. Los A disminuyeron (P < 0.05) en general los parámetros de la fermentación ruminal y la DIVMS en comparación con los E y los tratamientos de control (T y MON). Los (E) mostraron una respuesta similar (P < 0.05) a los tratamientos de control. Los (A) disminuyeron (P < 0.05) el CH<sub>4</sub> en un 13.33% en comparación con (E). En conclusión, hubo un efecto depresor de la fermentación ruminal y la producción de CH<sub>4</sub> para los aceites esenciales (A), en particular el de canela.

**Abstract:**

The objective of the study was to evaluate eight phytochemicals from four species in two presentations, essential oils (EO) of: Garlic (GEO), Cinnamon (CEO), Eucalyptus (EUEO), Rosemary (REO) (Lab. Rosa Elena Dueñas <sup>TM</sup>) and aqueous extracts of (AE) Garlic (GAE), Cinnamon (CAE), Eucalyptus (EUAE) and Rosemary (RAE) on ruminal fermentation with the gas production technique. Three sheep with ruminal cannula were the donors of ruminal fluid; the phytochemicals were evaluated at a dose of 900 mg/L with a basal diet (50% concentrate, 20% alfalfa and 30% corn silage, dry matter basis). It was evaluated: *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD), fractional volume of fermenting carbohydrates (FC), maximum volume of gas (Vmax), rate of gas production (S), lag time (L) and atmospheric pollution index (API =  $(V_{max} / IVDMD) * 100$ ). Methane was determined indirectly by capturing the gas and dissolving the CO<sub>2</sub> with KOH 1M. The trial data were analyzed based on completely randomized block design with factorial arrangement 2 (presentation) x 4 (species) plus two controls: Basal diet (Control) and 30 ppm of sodic monensin (MON), through PROC MIXED of SAS ©. Treatments effects were tested for the following contrasts: EO Vs AE, GEO Vs GAE, CEO Vs CAE, EUEO Vs EUAE, REO Vs RAE, Control Vs EO, Control Vs AE, MON Vs EO, MON Vs AE. The EO decreased (P < 0.05) in general the parameters of ruminal fermentation and the IVDMD in comparison with the AE and the control treatments (Control and MON). The AE showed a similar response (P > 0.05) to the control treatments. The EO decreased (P < 0.02) the % of CH<sub>4</sub> by 13.33% compared to AE. In conclusion, a depressant effect of ruminal fermentation was observed for essential oils, it also decreased methane production, particularly cinnamon.

## 1. Introducción.

La FAO (2016) cita que el crecimiento de la población mundial llegará a 9,600 millones de personas en el año 2050, con el doble de poder adquisitivo para el consumo de carne y derivados lácteos. Por lo que los sistemas agropecuarios deben ser más eficientes y sustentables con el ambiente, permitiendo reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y garantizar el bienestar del ecosistema y de las poblaciones rurales.

El sector de la agricultura, forestería y otros usos de tierra, aporta aproximadamente un cuarto (10 – 12 Gt CO<sub>2</sub> equivalentes/año) de las emisiones netas de gases de efecto invernadero (**GEI**) de origen antropogénico, primordialmente por la deforestación y las emisiones relacionadas con la agricultura (suelo, manejo de excretas y ganado). Las emisiones provienen en mayor parte por el óxido nitroso (**N<sub>2</sub>O**) liberado por los suelos para agricultura y el metano (**CH<sub>4</sub>**) liberado por la fermentación entérica, el manejo de excretas y los cultivos de arroz, en suma dan un total de 5 – 5.8 Gt CO<sub>2</sub> equivalentes/año) (IPCC 2014b)

Se ha estimado que las emisiones de gases de efecto invernadero provenientes de las actividades pecuarias aumentarán conforme se incremente la demanda de productos (O'Mara 2011). Los GEI más importantes emitidos por el sector agropecuario son dióxido de carbono (**CO<sub>2</sub>**), metano (**CH<sub>4</sub>**) y óxido nitroso (**N<sub>2</sub>O**); (IPCC 2007; FAO 2011), el CH<sub>4</sub> tiene un potencial de calentamiento 21-28 veces mayor al CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub> equivalente, CO<sub>2</sub>-e) (Ogle *et al.* 2014; IPCC 2014a). En este caso, la ganadería contribuye con el 16-25% de las emisiones mundiales de CH<sub>4</sub> a nivel mundial (Cobellis, Trabalza-Marinucci y Yu 2016) Las emisiones provenientes directamente de las actividades ganaderas representan cerca del 60% del total global de emisiones agropecuarias (FAO *et al.* 2013).

Para mitigar el impacto de la producción de metano y óxido nitroso (IPCC 2014b) se recomienda la conservación de los reservorios de carbono en suelos y vegetación, reduciendo la deforestación y la degradación de los bosques por fuego o agroforestería. En el ámbito del secuestro de carbono se recomienda incrementar el tamaño de las fuentes captadoras de carbono para captar CO<sub>2</sub> de la atmósfera

(reforestación, sistemas integrados, secuestro de carbono en suelos). Sustitución de combustibles fósiles o productos de alta demanda energética y de este modo reducir las emisiones de CO<sub>2</sub>. Como medidas extras se recomienda reducir las pérdidas y desperdicio de comida y cambios en la dieta humana dirigidos al consumo de productos con menos huella de carbono (IPCC 2014b)

En la mitigación de la producción de metano se han utilizado diferentes estrategias, entre ellas el uso de ionóforos y antibióticos. Sin embargo el incremento en la resistencia bacteriana y la regulación en el uso de dichos compuestos, han abierto una ventana para la búsqueda de alternativas naturales, tales como aceites esenciales y extractos de plantas (Patra y Yu 2013b; Wencelová *et al.* 2015).

En el presente estudio se evaluaron extractos acuosos y aceites esenciales de Ajo, Canela, Romero y Eucalipto en la fermentación ruminal *in vitro* y producción de metano.

## **2. Revisión de literatura.**

### **2.1. Gases de efecto invernadero.**

A nivel mundial existe una creciente preocupación por los cambios climáticos acelerados que se han presentado con el crecimiento de las diferentes industrias. La ganadería es una de las actividades de mayor importancia en el sector productivo mexicano y ha intensificado su producción en respuesta a la globalización de mercados; con ello el impacto ambiental que genera se ha hecho más grande. Un informe de la FAO señala que la ganadería es la principal actividad antropogénica del uso de la tierra y que genera aproximadamente un 18% de las emisiones de gases de efecto invernadero (Molina Botero *et al.* 2013), aunque otros autores afirman que contribuyen del 16-25% (Cobellis, Trabalza-Marinucci y Yu 2016). Los rumiantes contribuyen con 3.3% del total de emisiones globales de gases de efecto invernadero a nivel mundial (Knapp *et al.* 2014).

El metano (**CH<sub>4</sub>**) posee un potencial de calentamiento terrestre más poderoso comparado con el dióxido de carbono (**CO<sub>2</sub>**), hasta 21 veces más de acuerdo con el

panel internacional de cambio climático (IPCC 2014a) Globalmente se calcula que los rumiantes producen ~80 millones de toneladas de metano anualmente, lo que equivale a más o menos el 28% de las emisiones antropogénicas. (Beauchemin *et al.* 2008).

En un meta-análisis realizado por Pérez-Barbería (2017) analizan las emisiones globales de metano por varias especies de rumiantes silvestres, (Oveja, *Ovis aries*; Vaca, *Bos taurus*; Llama, *Lama gama*; Alpaca, *Vicugna pacos*; Ciervo Rojo, *Cervus elaphus*; Cabra, *Capra aegagrus*, Búfalo de agua, *Bubalus bubalis*, Yak, *Bos grunniens*.), concluyen que las vacas producen cantidades mayores de metano comparadas con los ciervos rojos, ovejas y cabras por unidad de Consumo de Materia Seca (**CMS**) con dietas de similar contenido en fibra. Este estudio reporta que al aumentar el CMS también aumenta la emisión de metano. En este sentido, se estima que la emisión de CH<sub>4</sub> de un bovino productor de leche en lactancia es en promedio de 369 g/día (Garnsworthy *et al.* 2012a). Con relación a los ovinos y caprinos, la emisión de CH<sub>4</sub> es de 21.9 y 13.74 g/día por animal respectivamente (Sejian *et al.* 2011).

Las dietas ricas en fibra deprimen la producción de metano, esto podría ser explicado por una tasa de pasaje más rápida del alimento a través del tracto digestivo, y un CMS más alto, lo que podría reducir las tasas de fermentación por la comunidad microbiana así como la reducción de hidrogeniones (H<sub>2</sub>) que son aprovechados por los metanógenos, cuando el consumo aumenta, la digestibilidad disminuye y también la producción de metano. (Pérez-Barbería 2017).

El CH<sub>4</sub> es un compuesto gaseoso muy importante en la fermentación del rumen (ya que disminuye la cantidad de hidrógeno disponible). Como el metano contiene energía en forma de iones de hidrógeno, los que ahora ya no están disponibles para la reducción del fumarato, su formación durante la fermentación ruminal es considerada una pérdida de la energía del alimento, esta pérdida se estima es del 2 al 12% (Kobayashi 2010), otros autores hablan del 2 al 15% de desecho de la energía ingerida, por otro lado, una larga porción (75-95%) del nitrógeno ingerido es degradado a amoníaco.(Busquet *et al.* 2006).

Otras reacciones como la reducción de nitratos y nitritos, la acetogénesis y la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados juegan un papel de menor importancia en el consumo de hidrogeniones en el rumen. (Kobayashi 2010).

El CH<sub>4</sub> no es generado por el animal *per sé*, pero es un producto natural de la digestión anaeróbica microbiana del material orgánico en el rumen del hospedero. El hidrógeno liberado es rápidamente capturado por un grupo altamente especializado de microorganismos, las arqueas metanogénicas, las cuales cumplen con sus propios requerimientos de energía reduciendo el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>. (McGrath *et al.* 2018). Poco después de la ingestión de alimento por el animal, el material fermentable es rápidamente colonizado y degradado por una población compleja, compuesta de bacterias, hongos, protozoarios y arqueas. Los productos secundarios de este proceso digestivo son los ácidos grasos volátiles, (**AGV's**) (principalmente acetato, propionato y butirato) que son aprovechados por el animal para cubrir sus requerimientos de energía.

Las emisiones de metano en los rumiantes se derivan principalmente por la fermentación entérica (87% por el rumen y 13% por el intestino grueso). El metano producido por la fermentación entérica es liberado al ambiente a través del eructo, la respiración y en pequeñas cantidades como flatulencia. (Cobellis, Trabalza-Marinucci y Yu 2016) Las excretas del ganado son también una fuente de salida del nitrógeno. El amoníaco representa un componente importante presente en las excretas, dicho componente degradado por la ureasa, una enzima microbiana presente en gran cantidad en las excretas y la tierra, la cual rápidamente convierte la urea excretada en amoníaco. El amoníaco a través de procesos de nitrificación puede ser oxidado a las formas de nitratos y óxido nítrico. Tanto amoníaco como nitritos pueden ser asimilados por las plantas, pero el amoníaco es un compuesto volátil que puede escapar a la atmósfera. (McAllister *et al.* 2011).

La tasa de emisión de metano por la fermentación ruminal está relacionada con las características físico-químicas de la dieta (digestibilidad de la materia seca **DMS**, y la concentración de fibra detergente neutro **FDN**) las cuales afectan directamente el nivel de consumo y la frecuencia de alimentación. Los rumiantes que producen más



metano son habitualmente los que consumen alimentos de baja calidad (con altos contenidos en lignina y celulosa, además de bajas cantidades de proteína y carbohidratos solubles), lo contrario sucede cuando se incluyen alimentos como leguminosas en la dieta, por su alto contenido proteico, bajos niveles de FDN y presencia de compuestos secundarios como taninos. (Molina Botero *et al.* 2013). Una vaca adulta libera alrededor de 200 litros de metano al día y existen 1.5 billones de vacas en la tierra, entonces el metano total liberado por vacas es alrededor de 300 billones de litros al día o 72 millones de toneladas al año. (Lyu *et al.* 2018).

Las emisiones de gases de efecto invernadero originadas por las actividades del sector agropecuario de México para el año 2010, se estimaron en 92,184.5 Giga gramos (Gg) de CO<sub>2</sub> equivalente (CO<sub>2</sub>eq). La contribución de la ganadería representa 49.4 % del total del sector (37,961.5 y 7,553.5 Gg CO<sub>2</sub>eq por fermentación entérica y manejo de estiércol respectivamente). Las emisiones promedio de CH<sub>4</sub> para este periodo se estimaron en 39,247 Gg. De esta cantidad 97 % se originaron por fermentación entérica y 3 % por manejo del estiércol (Garnsworthy *et al.* 2012b).

## Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero 2015

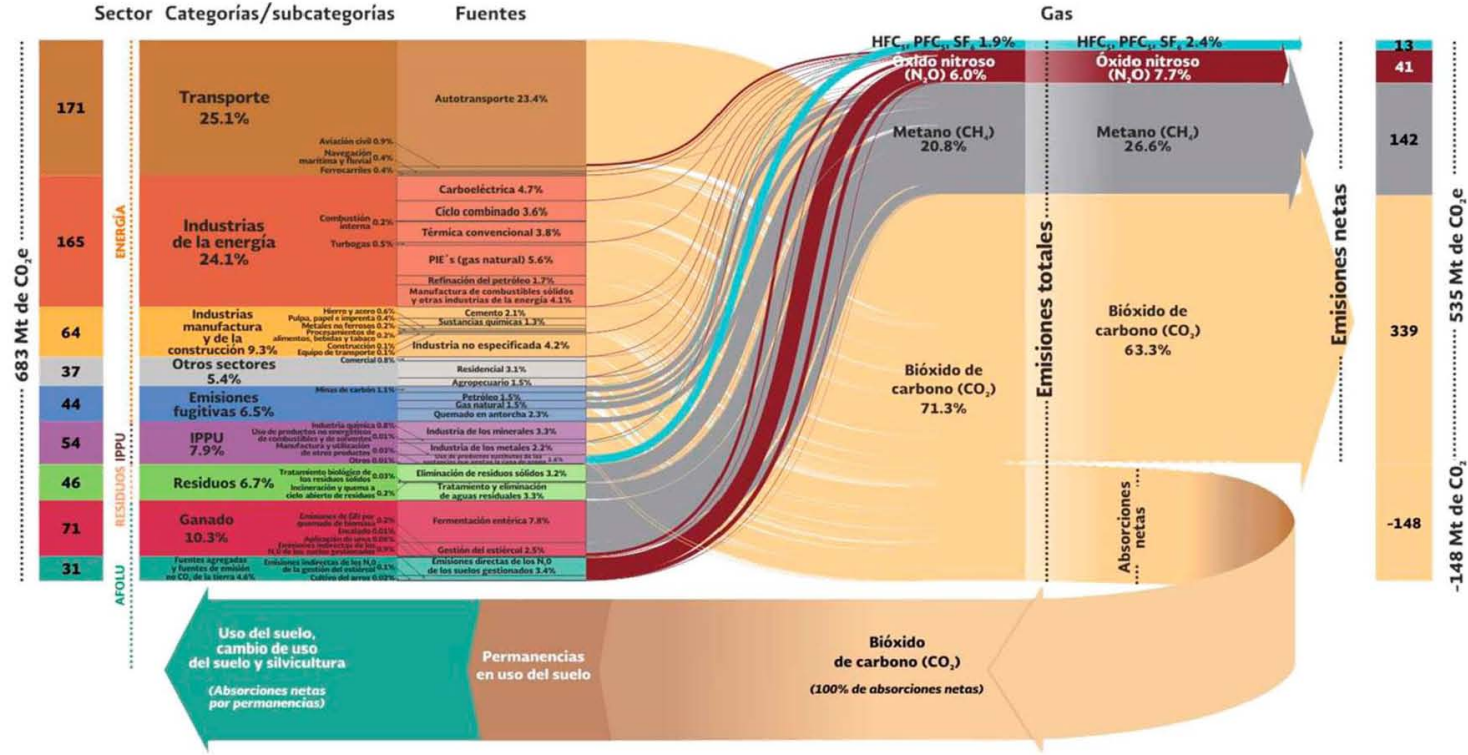


Figura 1 Inventario nacional de emisiones de GEI en México (INECC 2016)

## 2.2. Fermentación ruminal.

La digestión del alimento en el rumen ocurre por una combinación de fermentación bacteriana y ruptura física o molienda que sucede en el proceso de rumia. (Busquet *et al.* 2006).

El rumen es esencialmente una cámara de fermentación en la que los microbios ayudan a la digestión de la dieta, debido a que la microbiota tiene la capacidad de degradar diferentes componentes presentes en las plantas, estas pueden ser aprovechadas por los rumiantes. (Edwards *et al.* 2008). Hay un rango estrecho de sustrato disponible en el alimento (primordialmente polisacáridos, proteínas y lípidos), la microbiota puede ser generalista (que digiere varios tipos de sustratos) o especialista (que digiere sólo algunos sustratos específicos). Además puede ser clasificada de acuerdo al sustrato principal que fermentan, estos grupos son: celulolítica, proteolítica, lipolítica o fermentadora de aminoácidos (Cobellis *et al.* 2016).

La mayoría de la población ruminal son anaerobios obligados, capaces de degradar o fermentar polisacáridos estructurales o de almacenamiento, así como la proteína de las plantas (Cobellis *et al.* 2016) su equilibrio poblacional está sustentado por tres características principales: resistencia, resiliencia y redundancia funcional, con ello, los microorganismos pueden hacer frente a los cambios de la dieta, alternando rutas metabólicas y estabilizando un nuevo equilibrio con su propio ecosistema. (Edwards *et al.* 2008).

El ecosistema ruminal es uno de los medioambientes microbianos más ricos, habitado por numerosas especies de microorganismos. La comunidad de microbiota ruminal consiste en dos grupos de procariontes (*bacteria* y *archaea*) y dos grupos de eucariontes (*protista* y *fungi*) (Busquet *et al.* 2006) las bacterias y los protozoarios suman juntos un poco más del 90% de la biomasa microbiana. Su aislamiento y estudio han ayudado a conocer sus capacidades y metabolismos. (Weimer 2015). En el rumen habitan aproximadamente:  $10^{11}$  células bacterianas/g de líquido ruminal,  $10^4$ - $10^6$  células protozoarios /g de líquido ruminal,  $10^2$  -  $10^3$  células fungales/g de líquido ruminal, y aproximadamente  $10^9$  células

metanógenas/g de líquido ruminal. Solo alrededor del 10% de la población microbiana de este ecosistema ha sido identificada y descrita. (Pers-Kamczyc *et al.* 2011). La población de arqueas es muy importante para la funcionalidad del rumen; junto con las bacterias y los hongos, las arqueas son los primeros colonizadores del rumen. Estos metanógenos representan entre el 3 al 5 % de la biomasa microbiana del rumen (Cieslak *et al.* 2013; Patra *et al.* 2017).

### **2.2.1. Los carbohidratos.**

Desde el punto de vista de la nutrición de los rumiantes los carbohidratos se clasifican en dos grupos: Carbohidratos fibrosos (celulosa, hemicelulosa, lignina) y no fibrosos (almidones y azúcares simples) Existen también las pectinas que son constituyentes de la pared celular, aunque no se consideran parte de los carbohidratos fibrosos porque son solubles en una solución neutro detergente y su velocidad de fermentación ruminal (muy degradables en el rumen) los asemeja a los almidones, por lo que no se clasifican como carbohidratos estructurales no fibrosos (Van Soest 1982).

Los carbohidratos estructurales tienen una composición química de polisacáridos complejos (pectina, hemicelulosa, celulosa, unidos a lignina) y desde el punto de vista nutritivo constituyen la fibra vegetal. La fibra, como nutriente contribuye al funcionamiento normal del rumen. Su principal función es estimular la rumia, la secreción de saliva, las contracciones de la pared ruminal y la producción de elementos amortiguadores de la acidez para mantener el pH superior a 6.2 que favorece las bacterias fibrolíticas. En este aspecto es importante considerar que la fibra tiene una degradabilidad inferior a otros nutrientes y a medida que aumenta el contenido de fibra en la ración disminuye la ingestión de materia seca (efecto de saciedad) así como la concentración energética de la dieta. (William y Salazar, 2005).

Las paredes celulares de las plantas contienen una serie de polisacáridos, a menudo asociados o sustituidos por proteínas y compuestos fenólicos, en algunos casos incluso unidos al compuesto lignina. Los principales son: celulosa, arabinoxilano, D-Glucano,  $\beta$ -Glucano, xiloglucano, xilano y arabinogalactano. Los

bloques estructurales de estos carbohidratos son: arabinosa, xilosa, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, el ácido glucurónico y el ácido galacturónico (Nocek y Tamminga 1991; Galyean y May 1989). El maíz por ejemplo puede presentar promedios de 69% de almidón, 20% de azúcares de bajo peso molecular, 2% de celulosa, y 10.8% de fibra. (Bach Knudsen 1997)

### **2.2.1.1. Degradación de los carbohidratos en el rumen.**

Los carbohidratos se encuentran en forma de grandes moléculas insolubles que han de degradarse hasta compuestos más simples, para poder atravesar la mucosa del tracto digestivo y llegar a la sangre. Sin embargo los carbohidratos fibrosos no pueden ser fácilmente degradados por las enzimas gástricas. Es por ello que los rumiantes desarrollaron un complejo proceso de fermentación ruminal; este inicia con la adhesión y colonización microbiana de las partículas vegetales ingeridas por el animal. Existen dos etapas de degradación de los carbohidratos: la primera, consiste en la degradación de los carbohidratos complejos mediante enzimas celulasas y hemicelulasas. El almidón y los azúcares simples son hidrolizados por las amilasas, maltasas, maltosa fosforilasa, entre otras. La segunda etapa consiste en una fermentación intracelular de las pentosas y hexosas hasta convertirse en piruvato. (Galyean y May 1989; Nocek y Tamminga 1991) y propionato, esto ocurre sin que existan pérdidas de carbonos, lo que hace que el proceso de la fermentación hacia propionato sea energéticamente más eficaz que la fermentación acética. (Van Soest *et al.* 1991).

El piruvato es el componente intermedio a través del cual deben pasar todos los carbohidratos hasta la formación de los ácidos grasos volátiles (**AGV's**), principalmente acetato, propionato y butirato. Las bacterias celulolíticas utilizan mayoritariamente la vía metabólica piruvato-formato para producir acetato. Esta vía metabólica produce la decarboxilación del piruvato y da origen a la formación de **Acetil-CoA** y fumarato como productos intermedios. El Fumarato es transformado en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> que son precursores para la formación de metano, que a su vez se pierde a través del eructo. Este proceso resulta energéticamente menos eficaz, ya que se pierde un carbono e hidrógenos en forma de metano. (Figura 1. (William y

Salazar, 2005)) se calcula que el porcentaje de la energía perdida como metano está entre 12% y 15% (Eckard *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2009).

### **2.2.1.2. Ácidos grasos volátiles.**

Constituyen los principales productos de la fermentación ruminal. Los AGV's contienen de 1 a 7 átomos de carbono y se presentan en forma lineal (acético, propiónico, butírico y valérico) o como cadenas ramificadas (isobutírico, isovalérico, 2-metil butírico).

La concentración de AGV's totales en el rumen refleja el balance entre la producción y la absorción. Dicho balance oscila normalmente entre 70 a 130 **mM** (milimoles) (30 mM como mínimo y 200 mM como máximo) y su proporción depende del tipo de carbohidrato fermentado, de las especies bacterianas que intervienen y de las condiciones del medio en el rumen (Nocek y Tamminga, 1991) según la relación que exista entre forraje y alimento concentrado será entonces la producción y proporción de ácidos grasos volátiles. Un estudio llevado a cabo por (Ørskov *et al.* 1968), encontró que las dietas con 100% de inclusión de forraje (heno de alfalfa) presentaron promedios de 75% de ácido acético, 17% de ácido propiónico y 8% de ácido butírico, mientras que al incluir en la dieta un alto porcentaje de concentrado (20% heno de alfalfa y 80% de maíz molido y pasta de soya) presentaron promedios de 57% de ácido acético, 31% de ácido propiónico y 12.4% de ácido butírico, demostrando entonces que mientras mayor sea la cantidad de concentrado en la dieta, mayor será la proporción de ácido propiónico y butírico (sin ser nunca mayores que el ácido acético). Las dietas altas en fibra, estimulan el crecimiento de las especies bacterianas productoras de ácido acético y la proporción molar acetato:propionato:butirato, se encuentra típicamente, en el rango 70:20:10, mientras que, las dietas ricas en almidones y concentrados, favorecen el desarrollo de las especies bacterianas productoras de butirato y están asociadas con incrementos en la proporción de propionato a expensas del acetato (France y Dijkstra 2005).

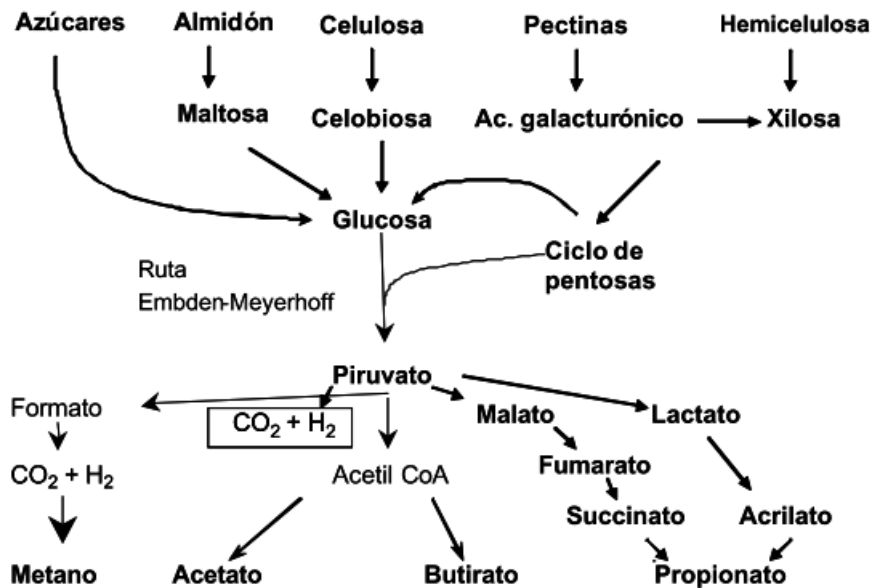


Figura 2 Esquema del metabolismo de los carbohidratos en el rumen, modificación por (William y Salazar, 2005).

Además de la producción de AGV's en el rumen acontece la formación de proteína de origen microbiano, el CO<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub>. Los AGV's y proteína microbiana formados en el rumen pueden proveer la mayoría de los requerimientos energéticos del animal (aproximadamente 80%, mientras que la proteína por su parte puede cubrir del 60 al 85%) (Busquet *et al.* 2006).

### 2.2.2. Proteínas y nitrógeno a nivel ruminal.

La proteólisis o degradación de la proteína es una serie de procesos que resultan en la hidrólisis de uno o más de las uniones peptídicas en una proteína, ya sea a través de un proceso catabólico mediado por enzimas proteolíticas microbianas llamadas proteasas o también puede existir degradación no enzimática, por ejemplo al exponer la proteína a un pH muy bajo o muy alto. (Varshavsky 2001).

En muchos aspectos la tarea clave en alimentar al rumen es producir proteína microbiana, para ello los sistemas que logran los requerimientos proteínicos necesitan evaluar:

- Degradación ruminal de la proteína (**DRP**).

- La capacidad del rumen de usar fuentes de nitrógeno no proteico (**NNP**) para la síntesis de proteína microbiana.
- El grado y la eficiencia con la que la degradación ruminal de la proteína puede ser utilizada para la síntesis de proteína microbiana.
- La variación en el valor del animal respecto a las diferentes proteínas que escapan de la degradación ruminal (proteína no degradable en rumen. **PNDR**).
- Pérdidas endógenas de proteína(Lean *et al.*, 2014).

El propósito de proporcionar alimentos con altos contenidos de proteína es satisfacer los requerimientos de proteína microbiana del ganado (NRC., 2001) La proteína degradable en rumen (**PDR**) es la fracción de la proteína que se reduce a péptidos y aminoácidos por las bacterias proteolíticas en el rumen, dichos péptidos son luego convertidos a ácidos grasos volátiles y amoníaco, mientras que el nitrógeno no proteico (NNP) provee amoníaco ruminal (France y Dijkstra 2005; Chalupa *et al.* 1984). El amoníaco ruminal y el NNP del alimento, pueden convertirse en aminoácidos por los microorganismos, si hay suficiente energía disponible de los carbohidratos. La proteína no degradable en rumen (**PNDR**) es la fracción de proteína que escapa a la fermentación en el rumen, esta, junto a la proteína microbiana, son absorbidas en el intestino delgado. Los excedentes de nitrógeno en forma de amoníaco y proteína son convertidos en urea para ser excretados o reciclados.(Lean *et al.* 2014)

### **2.2.2.1. Fracciones de la proteína.**

Para entender cómo se degradaban las diferentes fracciones de carbohidratos y proteínas, se desarrolló el Sistema **CNCPS** (Cornell Net Carbohydrate and Protein System) (Van Amburgh *et al.* 2015) el cual es un submodelo cinético que predice la fermentación ruminal. El modelo considera que la población ruminal está dividida en bacterias fermentadoras de carbohidratos estructurales (**BFCE**) y aquellas que fermentan carbohidratos no estructurales (**BFCNE**). Considera además que los protozoarios se acomodan por el descenso en el teórico rendimiento del crecimiento máximo (0.40g – 0.50g de células por gramo de carbohidrato fermentado) y los



rendimientos son ajustados para los requerimientos de mantenimiento (0.50g - 0.150g de células por carbohidrato fermentado por hora para BFCE y BFCNE respectivamente)(Russell *et al.* 1992). Las bacterias fermentadoras de carbohidratos estructurales no pueden usar el nitrógeno de aminoácidos, todo el N que utilizan debe venir del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) la utilización de dicho nitrógeno (amoníacos vs N amínico ( $-\text{NH}_2$ )) es dependiente de la disponibilidad de los péptidos y el tipo de carbohidrato que tiene la influencia primaria en el crecimiento. Por su parte, las bacterias fermentadoras de carbohidratos no estructurales obtienen el 66% de su N de los péptidos o aminoácidos y el 34% restante del amoníaco. Cuando se agotan los péptidos y aminoácidos, todo el N debe provenir del amoníaco.(Russell *et al.* 1992).

El aporte proteínico puede ser fraccionado según el aprovechamiento que puede darle el ganado, se han clasificado en los siguientes niveles:

Fracción A: (aminoácidos, péptidos, nitratos, amoníaco y urea) son altamente degradables en rumen, su digestión por hora en rumen va de 200 % a 100% proveen amoníaco y AGV's a las bacterias fermentadoras de carbohidratos estructurales. Los nitratos son usados para la producción de proteína y reducen la producción de metano, pero pueden ser tóxicos.

Fracción B1: (Globulinas y algunas albúminas) proteína verdadera, rápidamente degradable. Su digestión por hora en rumen es del 50 al 100%, proveen amoníaco, péptidos y aminoácidos.

Fracción B2: (Albúminas y gluteínas) Proteína verdadera de degradación intermedia. (5% - 15% de degradación por hora) provee amoníaco para las bacterias fermentadoras de carbohidratos estructurales y aminoácidos para el intestino delgado.

Fracción B3: (Prolaminas, proteínas largas, desnaturalizadas) Proteína verdadera de degradación lenta. (0.1% – 1.5% de degradación por hora) proveen aminoácidos al intestino delgado.

Fracción C: (complejos de Maillard, proteína ligada a lignina) Proteína verdadera indisponible para el tracto. (0% de degradación) (Sniffen *et al.* 1992).

La digestión de la fracción B2 en particular está sujeta a varias influencias en la dieta, tal como la tasa de fermentación y la tasa de pasaje. (Lean *et al.* 2014) las fracciones A y B1 son proteína degradable en rumen, mientras que las fracciones B3 y C son proteína de sobrepaso. Sin embargo la influencia de la tasa de degradación en el rumen y la tasa de pasaje pueden lograr que la fracción B3 pueda también contribuir a la proteína degradable en rumen. Por su parte, la fracción C no es digestible y escapa completamente del tracto digestivo. (Firkins *et al.* 1998).

Los métodos de medición de las fracciones de la proteína son similares, pero no idénticos, porque factores como el tamaño de los poros y el tamaño de las bolsas usadas puede variar. Es probable también que el estado fisiológico del animal (por ejemplo una vaca lactante contra una vaca seca) pueda cambiar la tasa de degradación ruminal y la tasa de pasaje intestinal. (Liebe *et al.* 2018).

### **2.2.3. Lípidos en rumen.**

Los lípidos entran al rumen y son hidrolizados en los compuestos que los constituyen, el glicerol y azúcares son fermentados y los ácidos grasos liberados pueden ser secuestrados por las células microbianas o someterse a la biohidrogenación para convertir los ácidos grasos insaturados tóxicos, en sus formas saturadas no tóxicas (Jarvis y Moore, 2010).

Se han identificado dos transformaciones microbianas de importancia a nivel ruminal: lipólisis y biohidrogenación. La lipólisis ocasiona la liberación de ácidos grasos libres (**AGL**) de los lípidos esterificados de las plantas, seguido de la biohidrogenación, la cual reduce el número de enlaces dobles. Los microorganismos pueden además sintetizar *de novo* ácidos grasos con carbohidratos precursores, de esta manera los lípidos que llegan a duodeno son ácidos grasos aportados por la dieta y la síntesis microbiana. (Jenkins 1993). Los lípidos esterificados de las plantas son consumidos y después hidrolizados por las

lipasas microbianas, causando la liberación de ácidos grasos constituyentes, estas lipasas hidrolizan los acilglicérols completamente a ácidos grasos libres (AGL) con pequeñas acumulaciones de mono o diglicéridos, los cuales son fermentados rápidamente en ácido propiónico en su mayor proporción. (Jenkins 1993).

### **2.2.3.1. Ácidos grasos insaturados en rumen.**

La carga de ácidos grasos insaturados en rumen, refleja el aporte total de ácidos grasos insaturados que llegan al rumen por medio del alimento. En estas fuentes podemos encontrar a diferentes pasturas, subproductos de destilerías, aceites de semillas, grasas y aceites, se recomienda que el consumo no exceda el 3.5% de la materia seca de la dieta. Los efectos negativos de los ácidos grasos insaturados incluyen una marcada reducción en la digestión ruminal de la fibra, cuando las concentraciones de los mismos son altas; los lípidos son tóxicos para algunas bacterias. Los ácidos grasos insaturados son efectivos reduciendo la producción de metano, (Lean *et al.* 2014) sin embargo disminuyen el consumo de materia seca, pueden interrumpir la producción de proteína microbiana y disminuir el porcentaje de proteína en leche. (Rabiee *et al.* 2012). Para escapar a los efectos tóxicos de los ácidos grasos insaturados, algunos microorganismos ruminales llevan a cabo reacciones de biohidrogenación en las cuales estos compuestos son reducidos a ácidos grasos saturados (Lourenço *et al.* 2010). Durante la biohidrogenación microbiana, algunos ácidos grasos bioactivos son formados, algunos de ellos escapan del rumen, son absorbidos en la circulación y entran a la glándula mamaria. Las rutas de la biohidrogenación han sido descritas para solo un puñado de microorganismos cultivados (Shingfield y Wallace, 2014) Varios isómeros bioactivos de ácidos grasos (C18: 2) y trans C18: 1 se forman durante la biohidrogenación microbiana en el rumen. (Pitta *et al.* 2018).

## **2.3. Formación de metano en el rumen.**

En la respiración aeróbica, la materia orgánica (como la glucosa) es oxidada a CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y reducida a H<sub>2</sub>O; en contraste durante la metanogénesis, el H<sub>2</sub> es oxidado a H<sup>+</sup>, y el CO<sub>2</sub> es reducido a CH<sub>4</sub>, aunque es similar en principio a otros tipos de

respiración, la metanogénesis tiene características distintivas, por ejemplo el gasto energético es muy bajo (1 ATP) por metano generado. Y solo los metanógenos pueden llevarlo a cabo (Lyu *et al.* 2018).

El rumen es un ambiente anaeróbico dónde el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub> fungen como los principales aceptores y donadores de electrones respectivamente. La degradación de la materia orgánica es llevada a cabo con la cooperación de diferentes grupos de anaerobios, estando los metanógenos en el fondo de la cadena trófica, pues usan los productos finales de la fermentación como substratos. La síntesis de metano contribuye a la eficiencia del sistema, ya que evita el incremento en la presión parcial de H<sub>2</sub> a niveles que puedan inhibir el funcionamiento normal de las enzimas microbianas involucradas en las reacciones de transferencia de electrones, particularmente la NADH deshidrogenasa, resultando en una acumulación de NADH y con ello, una reducción de la fermentación ruminal (Figura 2.) (Morgavi *et al.* 2010).

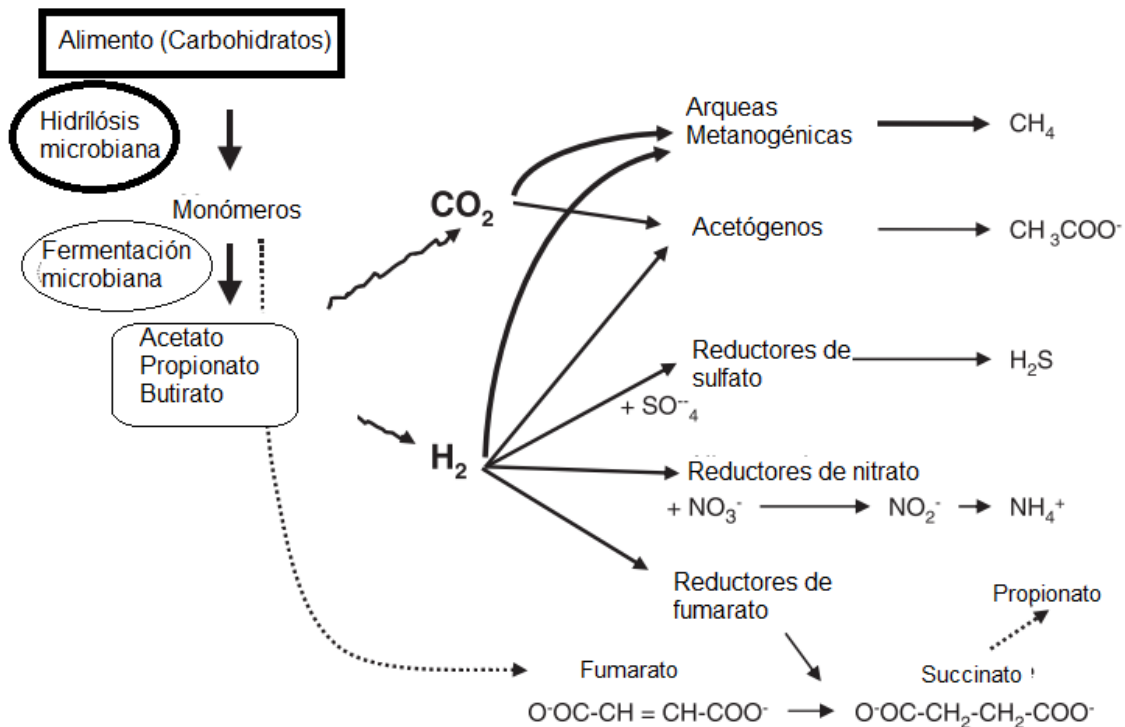


Figura 3 Esquema de fermentación microbiana de los polisacáridos y reducción del H<sub>2</sub> en el rumen, modificado de (Morgavi *et al.* 2010).

A pesar de que los metanógenos utilizan un número limitado de sustratos simples, su bioquímica es extraordinariamente compleja, envolviendo en ella al menos seis coenzimas inusuales, además de algunas reacciones que ocurren solo bajo potenciales de óxido-reducción extremadamente bajos. Los metanógenos están clasificados en 3 grupos (basado en el sustrato que utilizan: Hidrogenotrópicos, acetoclásticos y metilotrópicos.) la mayoría de los metanógenos descritos son hidrogenotrópicos (es decir oxidan H<sub>2</sub>, formiato o algunos alcoholes simples y reducen el CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub>) (Lyu *et al.* 2018).

La diversidad de los metanógenos del rumen es mucho menor que las bacterias, el ácido ribonucleico ribosómico de las arqueas solo representa un 6.8% del ácido ribonucleico ribosómico total. Solo ocho especies han sido aisladas en cultivos puros *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi*, and *Methanosarcina barkeri*. (Patra *et al.* 2017).

### **3. Estrategias para la reducción de metano.**

Existen múltiples estrategias para la reducción de metano, ellas van desde las simples estrategias nutricionales hasta el uso de varios aditivos.

#### **3.1. Selección genética.**

Diferencias entre animales han sido observadas, entre estas la selección de plantas durante el pastoreo, las tasas de pasaje ruminal y las interacciones huésped-microbios, dichas diferencias pueden ser heredables y consecuentemente ser herramientas de selección para animales con menores tasas de emisión de metano por día o por CMS (Ross *et al.* 2013).

Se ha demostrado que las emisiones individuales de CH<sub>4</sub> expresadas como g CH<sub>4</sub>/Kg CMS es un rasgo repetible(0.16 ±10) y heredable (0.30 ±0.26), así mismo se probó la persistencia individual de los rangos de emisión del CH<sub>4</sub> en ovejas, (Pinares-Patiño *et al.* 2011). Algunos otros estudios han demostrado un componente genético repetible asociado a la emisión de CH<sub>4</sub>, aunque sus

resultados se vean comprometidos a menudo, por la falta de mediciones en el consumo. (Robinson *et al.* 2010; Garnsworthy *et al.* 2012a; Goopy *et al.* 2011; Pinares-Patiño *et al.* 2013).

### **3.2. Químicos.**

El uso de algunos químicos y halógenos ha sido probado efectivamente, sin embargo tienen desventajas específicas que limitan su uso práctico. Algunos de los compuestos han demostrado ser contaminantes y poder dañar la capa de ozono, mientras que otros son demasiado caros o generan preocupaciones sobre la seguridad de los animales. Son sin embargo buenos para estudiar modelos donde la metanogénesis ruminal se ve drásticamente disminuida (Kobayashi 2010).

### **3.3. Vacunas.**

El uso de vacunas contra los organismos metanogénicos también ha sido probado y discutido. (Williams *et al.* 2009) describen un régimen de vacunación a borregos, donde se indujo una sustancial respuesta de anticuerpos en el suero en respuesta a los metanógenos, sin embargo no se redujo significativamente la emisión de metano y la densidad de los mismos. En una revisión más exhaustiva, pareciera que la vacunación si afectó a la diversidad y composición de la población metanogénica. La concentración de metanógenos no fue significativamente diferente entre los grupos control y los que recibieron tratamiento, sin embargo las poblaciones metanogénicas si fueron diferentes en ambos grupos.

### **3.4. Inhibidores enzimáticos.**

Pueden definirse como moléculas que se unen a enzimas y disminuyen su actividad. El uso de inhibidores de la producción de CH<sub>4</sub> entérico en la alimentación animal ha sido ampliamente estudiado desde el punto de vista productivo; en base a su estructura química es posible dividir a los inhibidores en dos categorías generales: 1) Los análogos del CH<sub>4</sub> como el cloroformo o el bromoclorometano y 2) los análogos de la coenzima M, como el bromoetanosulfonato y el 3-nitrooxypropanol. (NOP) (Romero-Pérez y Beauchemin, 2018), en el caso de este ultimo la adición de

NOP a una dieta mixta redujo la producción de CH<sub>4</sub> (mL g<sup>-1</sup> DM) hasta un 86.2% sin efectos en la digestibilidad. (Romero-Pérez *et al.* 2015)

El metano entérico es producido por las archeas, las cuales utilizan la metil-coenzima M reductasa (**MCR**) para catalizar la reducción de la metil-coenzima M (CH<sub>3</sub>-S-CoM) con la coenzima B, de esta manera obtienen las molécula de CH<sub>4</sub> y heterodisulfidos durante el último paso de la metanogénesis (Shima y Thauer, 2005).

### 3.4.1. 3-Nitrooxypropanol (NOP).

Es un inhibidor del CH<sub>4</sub>, su estructura química es similar a la Metil-coenzima M (CH<sub>3</sub>-S-CoM), el cual inhibe la metanogénesis inhibiendo la forma activa de la metil-coenzima M reductasa (MCR) *via* un mecanismo de tipo radical en el que el nitrito es liberado como un producto secundario (Prakash 2014). Hasta ahora, el principal papel inhibidor de los nitrocompuestos en la producción de metano a nivel ruminal se atribuye a que estos compuestos sirven como receptores alternativos de electrones, su consumo competitivo de equivalentes reductores y el efecto inhibitorio en el H<sub>2</sub> y la oxidación del fumarato. Por otra parte, el destino metabólico de estos nitrocompuestos es en mayor parte compuestos nitrogenados y en menor parte nitrito. Por ejemplo, la reducción ruminal de los grupos nitrito del 3NPOH y 3NPA lleva a la formación de sus correspondientes aminas, 3-aminopropan-1-ol y el ácido 3-aminopropiónico ( $\beta$ -alanina), de esta manera, es posible utilizar nitrocompuestos como inhibidores efectivos de la metanogénesis ruminal (Zhang *et al.* 2018). Actualmente el **NOP** ha sido identificado como inhibidor metanogénico por su especificidad hacia la MCR, enzima que cataliza el último paso de la metanogénesis, esto son la reducción de la metil CoM y la coenzima-B, a metano y un complejo CoM-CoB. (Zhang *et al.* 2018) De manera positiva, el efecto inhibitorio del NOP, a diferencia de otros inhibidores de la metanogénesis, es persistente después de las 12 semanas de tratamiento (Hristov *et al.* 2015), lo que ofrece una práctica efectiva para las industrias ganaderas.

De acuerdo con el trabajo de Romero-Pérez *et al.* (2015) la adición de NOP disminuyó hasta el 86.2% de la producción de CH<sub>4</sub> (mL g<sup>-1</sup> MS) sin afectar la

digestibilidad, este fue además el primer estudio que probó diferentes niveles de inclusión del NOP (5,10 y 20 mg NOP/día); ellos encontraron además una reducción de la proporción molar del acetato, incremento del isovalerato y del pH ruminal. La reducción del CH<sub>4</sub> indica una redirección del hidrógeno metabólico a la síntesis de AGV's, sin embargo el hidrógeno metabólico fue también utilizado para la producción de H<sup>+</sup> (que explica el aumento del pH) y que representa también una pérdida de energía. El mecanismo del 3-NOP se ha demostrado en modelos *in vitro* (Duin *et al.* 2016) sin embargo los efectos directos de este compuesto en las arqueas ruminales y la ruta de la metanogénesis necesitan ser más explorados.

### **3.5. Estrategias nutricionales.**

Los cambios de la composición de nutrientes y el incremento de proporción de alimentos concentrados reduce el pH, consecuentemente afecta a las poblaciones de protozoarios. (Kumar *et al.* 2013) además de reducir la relación acetato: propionato, consecuentemente reduciendo la cantidad de CH<sub>4</sub> producido por unidad de alimento ingerido (Beauchemin *et al.* 2008). Otra estrategia es la selección de forrajes de más alta calidad (con bajo contenido en FDN y alto contenido en carbohidratos solubles). Pinares-Patiño *et al.* (2011) Encontraron que la diferencia de producción de CH<sub>4</sub> entre ovejas alimentadas con concentrados y forrajes, era mucho menor para las dietas peletizadas, conteniendo menor FDN y mayor contenido de carbohidratos solubles.

El mantenimiento de la alta productividad en rumiantes así como el incremento en la calidad y cantidad de sus productos está asociado con el uso de dietas altas en concentrado, que tienen efectos negativos en el ecosistema ruminal. (Wencelová *et al.* 2015) las modificaciones del patrón de fermentación ruminal para reducir la emisión de metano y amoníaco usando aditivos (cómo probióticos, ácidos orgánicos, levaduras, enzimas y antibióticos como la monensina sódica) han sido usados para eficientar los sistemas productivos.

De acuerdo con Jouany y Morgavi, (2007) existen cuatro razones principales que pueden explicar cómo los aditivos alimenticios pueden optimizar la función ruminal:

- 1) Disminuir la producción de metano en favor del propionato, para con ello



umentar la energía disponible para los animales, 2) reduciendo la degradación de proteína alimenticia para incrementar la biodisponibilidad de los aminoácidos en el intestino delgado; 3) reduciendo la tasa de fermentación de los carbohidratos rápidamente fermentables, como el almidón y sacarosa, 4) controlando la concentración de ácido láctico y mejorando la digestión de la fibra.

### **3.5.1. Nitratos.**

El nitrato es generalmente considerado un compuesto indeseable en los alimentos para rumiantes, dado la capacidad que tiene de inducir metahemoglobinemia, el hecho de que es un carcinógeno y una posible interferencia con el metabolismo de la vitamina A. (Bruning-Fann & Kaneene 1993; Sindelar & Milkowski 2012) sin embargo y a pesar de estas limitantes, el nitrato ha sido probado como un aceptor de electrones, lo cual puede reducir la metanogénesis a nivel ruminal. (Lee y Beauchemin 2014).

Algunos estudios *in vivo* han confirmado la eficiencia de adicionar nitrato para reducir las emisiones entéricas de metano, sin los signos de intoxicación (Nolan *et al.* 2010; Li *et al.* 2011; van Zijderveld *et al.* 2011). En un estudio en vacas lecheras (Olijhoek *et al.* 2016) adicionaron 5.3 a 21.1g de nitratos/kg de MS en vacas lecheras y observaron una disminución (efecto lineal,  $P < 0.01$ ) en la producción de metano (491 a 396 L/d). Otros estudios recientes que utilizaron vacas en pastoreo (van Wyngaard *et al.* 2018) demostraron que puede existir un rechazo parcial de los suplementos con nitrato (23g/Kg MS) debido a sus características organolépticas. El nitrato adicionado en la dieta de vacas en pastoreo tendió a reducir la emisión de metano mientras mejoraba el ambiente ruminal para la proliferación de las bacterias fibrolíticas.

### **3.5.2. Suplementación de lípidos.**

Los lípidos son utilizados originalmente en las raciones para rumiantes con el fin de incrementar la densidad energética del alimento, la producción de metano ha sido reducida consistentemente añadiendo grasa o ácidos grasos en las dietas y está estimado que puede reducir las emisiones de metano de 4 – 5% (g/Kg CMS) por

cada 1% de incremento en el contenido de lípidos en la dieta (Grainger y Beauchemin, 2011).

### **3.5.3. Adición de ácidos orgánicos.**

La inclusión de ácidos orgánicos (por ejemplo el ácido málico y el fumárico) o sus sales sódicas en las dietas, resulta en un cambio de la fermentación ruminal hacia el propionato, por lo tanto menos producción de metano. Por ejemplo la adición de fumarato de sodio consistentemente disminuyó la producción de metano *in vitro* un 2.3 -41% (Ungerfeld *et al.* 2007).

### **3.6. Uso de ionóforos.**

El uso de ionóforos ha demostrado mejorar el rendimiento y la salud en vacas lecheras y cárnicas. Sin embargo el uso de antibióticos en vacas lecheras ha sido prohibido en Estados Unidos de América y Europa motivado por la aparición de residuos en la leche (Busquet, *et al.* 2005; Castro-Montoya *et al.* 2015).

Los ionóforos como la Monensina sódica son típicamente usados en la producción comercial de vacas de carne y leche para modular el consumo, controlar el timpanismo y aumentar la eficiencia productiva. Monensina puede incrementar la relación acetato : propionato de los AGV's del líquido ruminal, aumentando el flujo de equivalentes reductores para formar propionato, también puede reducir el número de protozoarios ruminales (Beauchemin *et al.* 2008) desafortunadamente los efectos inhibitorios en la metanogénesis pueden no persistir en el tiempo (Johnson y Johnson, 1995).

Su estructura molecular contiene muchos oxígenos espaciados en la molécula, la posición de dichos oxígenos crea cavidades en la que se pueden atrapar cationes, la molécula se pega a la bacteria, lo que facilita el movimiento de cationes por protones. (Pressman 1976) Cada ionóforo es capaz de formar un complejo con un catión, este se une a las bacterias y se solubiliza en la bicapa lipídica de la membrana celular. Una vez solubilizado en la membrana celular, el complejo catiónico se intercambia por un protón. Los gradientes de cationes y las afinidades catiónicas relativas de los ionóforos dirigen los intercambios de iones primarios y

secundarios resultantes. Como el mayor gradiente de concentración es el K<sup>+</sup> citoplásmico en comparación con el K<sup>+</sup> extracelular, esto impulsa el intercambio de un K<sup>+</sup> intracelular por un protón extracelular. Después de haber depositado el complejo catiónico en el fluido ruminal, el ionóforo recompone un catión extracelular y revierte el proceso (Russell y Strobel, 1989).

Las bacterias Gram-positivas se ven obligadas a utilizar sistemas de transporte celular para disipar el H<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> intracelular, mediante las bombas de protones-ATPasa y ATPasa de sodio expulsan los hidrogeniones (H<sup>+</sup>) y el Na<sup>+</sup> intracelular a expensas de 1 ATP, con ello, se reduce la energía disponible para la división celular, la reducción del K<sup>+</sup> intracelular y probablemente las tasas de síntesis de proteínas. La muerte celular probablemente se debe a la acidificación del citoplasma. (Guffanti *et al.* 1979).

### **3.7. Fitoquímicos (extractos de plantas).**

Recientemente productos naturales han sido usados para enriquecer la eficiencia del aprovechamiento de los recursos alimenticios. Sin embargo poca información se encuentra disponible sobre el potencial de las hierbas tradicionales medicinales y sobre la forma en la que modifican las características de fermentación en el rumen. (Wencelová *et al.* 2015).

Los extractos de plantas, incluyendo sus aceites esenciales, han sido usados por siglos en la medicina tradicional, para aplicaciones industriales y como preservadores de alimentos dada su actividad antimicrobiana y porque la mayoría de ellos son considerados seguros para el consumo humano. (Busquet *et al.* 2005).

Los extractos deben su actividad metabólica a compuestos orgánicos secundarios (es decir no están involucrados en los procesos bioquímicos primarios como el crecimiento, el desarrollo o la reproducción de las plantas) pero son importantes para la protección contra insectos, depredación e infecciones microbianas. (Cobellis *et al.*, 2016). Su actividad antimicrobiana es atribuida a algunos metabolitos como las saponinas, los terpenoides (como el carvacrol, carvona, timol, etc.), los fenilpropanoides (como el cinamaldehído, el eugenol o el anetol) (Busquet *et al.*

2006) y los taninos.(Jayanegara *et al.* 2015), estos compuestos pueden afectar la metanogénesis inhibiendo el crecimiento, desarrollo y actividad de las poblaciones bacterianas, protozoarios, y arqueas metanogénicas, de esta manera pueden ayudar a disminuir la metanogénesis (Patra y Saxena, 2010; Kumar *et al.* 2014).

Esto puede ser indirectamente (al reducir los protozoarios asociados a los metanógenos) y directamente afectando a los metanógenos, así como la digestión del alimento y el proceso de fermentación (Cobellis *et al.* 2016). Además, los componentes de las plantas tal vez también causen un cambio hacia la producción de propionato, lo cual afecta a la metanogénesis al reducir la competencia por los hidrógenos libres. (Cieslak *et al.* 2013).

### **3.7.1. Taninos.**

Los taninos son los compuestos secundarios más abundantes en la mayoría de las plantas, representan el cuarto grupo más abundante de compuestos en el tejido de las plantas, después de la celulosa, hemicelulosa y lignina, las plantas pueden contener hasta un 20% de su peso seco en taninos, esta proporción es variable y cambia en respuesta al estrés ambiental (por ejemplo la sequía.) (Kraus *et al.* 2003). Estos compuestos polifenólicos solubles en agua, tienen un alto peso molecular y la habilidad de precipitar proteína. Están ampliamente distribuidos en varias especies de árboles forrajeros, arbustos, leguminosas, cereales y granos; a menudo su presencia limita el uso de dichos alimentos como ingredientes de una ración.

Primordialmente existen dos tipos diferentes: 1) Taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables son moléculas complejas con un grupo poliol como núcleo central así como la glucosa, glucitol, ácido quínico, quercitol y ácido shikímico, este último puede estar parcial o totalmente esterificado con un grupo fenólico (por ejemplo el ácido gálico.) (Patra y Saxena, 2009; Vázquez Flores *et al.*, 2012). Se pueden separar en galiotaninos y elagitaninos formados a partir de ácido gálico o ésteres de ácido hexahidroxidifenólico, respectivamente, pueden estar unidos a un azúcar. (Adamczyk *et al.* 2017). Su hidrólisis ocurre por la acción de ácidos, bases o esterasas que producen poliol y los ácidos fenólicos constituyentes (Patra y Saxena 2010).

Las taninos condensados (proantocianidinas) son polímeros de flavonoles de tres anillos, unidos mediante enlaces carbono-carbono. (Shaw *et al.* 1990) . Los monómeros de los taninos condensados está divididos en: procianidinas y prodelfinidinas. Los hallazgos más recientes apuntan a un órgano derivado del cloroplasto llamado taninosoma como la ubicación de la producción de taninos a nivel celular. (Brillouet *et al.* 2014; Adamczyk *et al.* 2017).

La actividad de los taninos en el rumen es aun parcialmente desconocida, pero se cree que trabajan similar a las saponinas, formando complejos con la pared o membrana de los microorganismos del rumen. Numerosos estudios realizados en la suplementación con taninos han sugerido un vínculo fuerte con la presencia de estos compuestos y la mitigación de la producción de metano, pero dichos efectos parecen ser atribuidos principalmente a la inhibición de la degradación de la fibra, sin embargo, los taninos condensados han mostrado reducir la producción de metano, debido a su actividad contra algunas archanobacterias. (Cobellis *et al.* 2016; Lorenz *et al.* 2014).

Estos compuestos son capaces de proteger la proteína de la dieta de la rápida y excesiva degradación que pudiera sufrir en el rumen, lo anterior se logra mediante la formación de complejos insolubles tanino-proteína, los que reducen la fragmentación de dicha proteína, como resultado menos amoniaco (Lorenz *et al.* 2014) como resultado menos amoniaco es producido, la pérdida de nitrógeno de la proteína dietaria también se reduce y el flujo de aminoácidos hacia el intestino delgado aumenta (Mokhtarpour *et al.* 2016) Los taninos pueden mitigar las emisiones de metano inhibiendo el crecimiento de protozoarios y arqueas metanogénicas (Saminathan *et al.* 2016; Yang *et al.* 2017).

### **3.7.2. Saponinas.**

Son compuestos fitoquímicos encontrados en muchos géneros de plantas, tradicionalmente dichas plantas han sido utilizadas como sustitutos de jabón. Químicamente, las saponinas son glucósidos de bajo peso molecular, en los cuales una aglicona triterpeno pentacíclica o un esteroide tetracíclico, está unida a una o más cadenas de azúcares. (Patra y Saxena 2009; Osbourn 1996). Las propiedades

tensoactivas son las que distinguen estos compuestos de otros glucósidos. Las saponinas se clasifican en dos grupos en función de la naturaleza de su esqueleto de aglicona (sapogenina): saponinas esteroidales y saponinas triterpenoides. Los glicoalcaloides esteroideos a veces se consideran un tercer tipo de saponinas. (Hostettmann y Marston 1995; Sparg *et al.* 2004).

### **3.7.2.1. Efectos de las Saponinas.**

Los protozoarios ciliados son habitantes normales en el ecosistema del rumen y son primariamente responsables de una substancial reducción de la formación de proteína bacteriana, efecto causado por la depredación de los protozoarios hacia las bacterias. Consecuentemente la economía del nitrógeno en el rumen podría verse beneficiada por la reducción de protozoarios; sin embargo esta defaunación ruminal tiene un efecto de disminución en la degradación de la fibra. La remoción o supresión de los protozoarios, podría resultar en un incremento en la síntesis proteica bacteriana, sobre todo en dietas con bajo contenido en proteína. La actividad anti-protozoarios es el efecto más consistente de las saponinas en el rumen, dado que forman complejos en la membrana celular de dichos microorganismos, causando su destrucción. (Patra y Saxena, 2009).

Existe suficiente evidencia *in vivo* e *in vitro* publicada sobre la actividad inhibitoria de las saponinas sobre la síntesis del CH<sub>4</sub> (Bodas *et al.* 2012; Flachowsky y Lebzien 2012; Patra y Yu 2013a), sus efectos contra protozoarios (Lovett *et al.* 2006; Santoso *et al.* 2007). Su habilidad para modificar la fermentación ruminal mediante la influencia directa en la composición y actividad de los protozoarios, bacterias, hongos y arqueas ruminales (Patra y Yu 2015; Salem 2012; Mendel *et al.* 2017).

### **3.7.3. Aceites esenciales.**

Se cree que el término “aceite esencial” es un derivado de “Quinta esencia” un nombre dado a los componentes efectivos de los fármacos por Paracelsus von Hobenheim, médico pionero suizo, sin embargo, el término aceite esencial es engañoso, dado que no son como su nombre lo sugiere “esenciales” para la nutrición o metabolismo. Se trata de compuestos volátiles y aromáticos con

aparición oleosa, que son obtenidos de las plantas. Dichos compuestos han sido usados también como fragancias, saborizantes y preservadores. Típicamente son extraídos de las plantas por un proceso de destilación de vapores, usando agua o solventes polares como el alcohol, a veces con muchos procesos de destilación combinados, a menor escala la extracción usando otros métodos (como extracción por solventes o la extracción con dióxido de carbono bajo presión) ha tenido resultados más exitosos, teniendo una bioactividad mayor o más contrastante, dada la naturaleza volátil de los aceites esenciales, comparado con los destilados al vapor (Hart *et al.* 2008).

Son fundamentalmente complejas mezclas de metabolitos secundarios, pueden contener de 20 a 60 sustancias químicas, como alcoholes, aldehídos, hidrocarburos, acetonas, ésteres y éteres. La mayoría de los componentes de los aceites esenciales pueden ser categorizados como terpenos ( $C_{10}H_{16}$ ), fenilpropanoides y terpenoides. El efecto individual de los aceites esenciales depende de su estructura, es la suma de su composición química y su grupo funcional, por ejemplo terpenoides o fenoles. Ellos causan alteraciones en el transporte de iones (electrones) a través de la membrana celular, mitigan también la translocación de proteínas, las fosforilaciones y las reacciones dependientes de enzimas que tienen lugar en la membrana (Jouany y Morgavi, 2007).

Los aceites esenciales pueden estar constituidos de compuestos volátiles de origen terpénico y no terpénico. Bajo este grupo cientos de moléculas grandes o pequeñas pueden estar presentes, dichas pueden estar constituidas como hidrocarburos y sus derivados oxigenados. Algunos de estos compuestos pueden tener además nitrógeno o sulfuro. Pueden existir en la forma de alcoholes, ácidos, ésteres, epóxidos, aldehídos, quetonas, aminas y sulfidos, en algunos casos también se han encontrado compuestos halogenados. La composición del aceite esencial es característico de la especie de planta y es responsable de su aroma particular. El nivel y composición de estos compuestos depende de la variedad de la planta, factores ambientales, tiempo de cosecha, etc. (Cieslak *et al.* 2013).

En un experimento llevado a cabo por (Busquet *et al.* 2005) el aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) fue usado como suplemento. En contraste con los aceites esenciales que son activos únicamente contra bacterias Gram positivas, el aceite esencial de ajo es activo contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, virus y parásitos. El mecanismo principal del aceite de ajo está relacionado con la capacidad de reaccionar con los grupos –SH (Cieslak *et al.* 2013).

### **3.7.4. Fitoquímicos presentes en el Romero, Eucalipto y Canela.**

#### **3.7.4.1. Terpenos.**

Terpenos o isoprenoides, son sintetizados a partir del isopentil di- fosfato (isopreno) y se clasifican basados en el número de las unidades del isopreno. Los monoterpenos (C<sub>10</sub>) son las moléculas más representativas en los aceites esenciales, pudiendo constituir hasta el 90% de los compuestos (ej. Limoneno, Timol, Carvacrol, Linalool, Carvona, y Acetato de Geranilo). Los diterpenos son ácidos, que contienen resinas de gimnospermas (ej. Ácido abiético) y otros compuestos como el tocoferol, el retinol y el fitol. Los triterpenos por su parte están ampliamente distribuidos en el reino de las plantas y son usados frecuentemente por sus propiedades farmacológicas (Bodas *et al.* 2012).

#### **3.7.4.2. Compuestos fenólicos.**

Los fenoles están caracterizados por tener al menos un anillo aromático de benceno, con uno o más grupos hidroxilo. Son sintetizados a partir de unidades de Acetil CoA. (Bodas *et al.* 2012) Son comúnmente encontrados en el reino vegetal, donde protegen a las plantas de infecciones microbianas, radiación ultravioleta y estrés químico. Es un gran grupo de fitoquímicos y está clasificado en muchas subclases dependiente de sus estructuras químicas; entre estas encontramos: fenoles simples, ácidos fenólicos, aldehídos, cumarinas, flavonoides, chalconas, auronas, benzofenonas, xantonas, estilbenos, benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinonas, betacianinos, lignanos y polifenoles. Los alimentos que los contienen tienen propiedades anti-oxidativas, además de potentes propiedades anti-microbianas (Patra 2012).



### **3.7.5. Compuestos presentes en la canela.**

#### **3.7.5.1. Fenilpropanoides.**

Son compuestos aromáticos derivados de la fenilalanina y están compuestos por un anillo de benceno (C<sub>6</sub>) con una cadena propiónica (C<sub>3</sub>) lateral. En la mayoría de las plantas el contenido de fenilpropanoides es menor que el de terpenos, pero existen algunas excepciones (ej. La canela, el clavo, el anís) Su función en conjunto con otros elementos del aceite esencial es defender a la planta contra depredadores, parásitos, estrés ambiental, y enfermedades. Algunos aceites esenciales también protegen contra la competencia interespecie y pueden atraer insectos involucrados en el proceso reproductivo. (Cobellis *et al.*, 2016).

Los aceites esenciales son encontrados en varios sitios en la planta, incluyendo raíces, corteza, flores, pétalos, hojas, frutos y pistilos. Las concentraciones de dichos compuestos varían entre individuos debido al estado de madurez, salud de la planta, edad y otros factores ambientales como la luz, la temperatura y el estrés causado por la humedad. Se cree que debido a su naturaleza hidrofóbica y afinidad por los lípidos, pueden destruir la membrana citoplasmática directamente o pueden dañar la proteína de las membranas, incrementando la permeabilidad citoplasmática o dejando salir algunos constituyentes del citoplasma mismo, resultando en un agotamiento de la fuerza motriz; además pueden causar coagulación citoplasmática y eventualmente conducir a la lisis celular. Se ha sugerido además que las bacterias Gram positivas tienden a tener una mayor resistencia a los aceites esenciales que las Gram negativas. (Hart *et al.* 2008).

### **3.7.6. Compuestos presentes en el Ajo.**

#### **3.7.6.1. Organosulfuros: (Tiosulfinato).**

Son moléculas orgánicas que contienen una o más uniones carbono-sulfuro. Estos compuestos están presentes particularmente en vegetales del género *Allium* Y *Brassica* y son convertidos a una variedad de otros compuestos que contienen sulfuros vía hidrólisis cuando los bulbos de estas plantas son dañados o cortados. Estos compuestos muestran diversas propiedades bioactivas, así como actividad antimicrobiana, la cual ha sido reportada contra un amplio espectro de bacterias, hongos y virus (Patra 2012).

Los bulbos intactos del ajo poseen ciertos compuestos sulfurados llamados S-Alkanil – L – cistein sulfóxido y S-Alicistein sulfóxido. Los cuales son aminoácidos incoloros, inodoros y solubles en agua. Están presentes entre el 1 y el 5 % del peso seco de la planta. Sin embargo, cuando las células son dañadas, la enzima alinasa libera y convierte dichos compuestos en otros componentes volátiles y reactivos llamados Tiosulfatos. El más abundante de ellos es llamado Alicina. En diversos estudios se ha comprobado su potencial contra bacterias; siendo más un bacteriostático que un bactericida, en concentraciones altas ha demostrado ser eficaz contra una amplia variedad de bacterias, tanto Gram negativas como positivas. Se sugiere que la acción antibacterial de la Alicina es causada por una rápida y completa inhibición de la síntesis del **ARN** y adicionalmente una inhibición parcial de la síntesis de proteínas del **ADN** (Patra 2012).

#### **4. Sistemas de evaluación de la fermentación ruminal.**

##### **4.1. Evaluación de la digestibilidad in situ.**

Desde la mitad del siglo pasado (Quin y Myburgh, 1943) planteaban la viabilidad de usar bolsas cilíndricas hechas de una delgada seda natural, para medir la digestión de alimentos en el rumen de ovejas canuladas y desde entonces se ha utilizado la técnica para varios propósitos. La técnica *in situ* fue originalmente aplicada para estudiar la degradación del forraje en el rumen. (Van Keuren y Heinemann, 1962; Hopson *et al.* 1963) La técnica mide la desaparición de los constituyentes del alimento en bolsas que contienen la dieta a probar después de periodos de tiempo variables. Por su parte Mehrez y Ørskov, (1977) utilizan bolsas de nylon en la que incuban diferentes sustratos en animales canulados en el rumen, con ello obtienen información acerca de la tasa de fermentación retirando las bolsas a determinados intervalos de tiempo y midiendo la materia seca degradada de la bolsa. Para describir lo que ocurría dentro de las bolsas (Ørskov y McDonald 1979) obtuvieron una ecuación exponencial que describía el modelo, la ecuación era la siguiente:  $p = a + b(1 - e^{-ct})$  donde  $p$  es la pérdida de materia seca al tiempo  $t$  y  $a$ ,  $b$  y  $c$  son constantes. Si la fermentación ocurre de manera normal  $a$  puede ser considerada

como el material inmediatamente soluble, **b** la fracción insoluble pero fermentable y **c** la tasa constante.

Se ha encontrado que existe una alta correlación entre las pruebas de digestibilidad *in vitro* e *In situ* (Blümmel y Ørskov, 1993; Nanon *et al.* 2014) tanto para degradación de materia seca como para la degradación por fracciones de la proteína (Liebe *et al.* 2018). Se sugiere el uso de al menos dos animales canulados y tres bolsas por sustrato incubado (Castillo-Gallegos *et al.* 2012) como particularidades se sugiere también el uso de bolsas con poros de 20 µm (que como desventaja presentan una tendencia a llenarse de gas), ya que las que se encuentran en rangos de 50 a 30 µm pueden tener pérdidas substanciales de almidón secundario durante la incubación, sobre todo con el uso de granos suaves como el maíz (Seifried *et al.* 2015).

Al respecto de los lineamientos generales para los procedimientos *In situ*. (Nocek 1988) recomienda lo siguiente:

*Cuadro 1 Recomendaciones para procedimientos de digestión in situ.*

Porosidad de la bolsa	De 40 a 60 µm
Tamaño de partícula	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alimentos proteicos y energéticos, 2 mm.</li> <li>• Granos de cereal completos, subproductos fibrosos, 5mm</li> <li>• Henos (&gt;80% M.S.), 5mm</li> <li>• Ensilados (60% - 70% M.S.) 5mm</li> </ul>
Relación Tamaño de la muestra / superficie de área	10 a 20 mg/cm <sup>2</sup>
Contaminación microbiana	Independientemente del marcador (DAPA, ARN, N <sup>15</sup> , S <sup>35</sup> , etc) debe realizarse una corrección especial para forrajes de baja calidad.

Dieta	Alimento que cubra los requerimientos nutricionales de los animales de prueba. Evaluado en su composición, Relación forraje – concentrado que cubra los requerimientos energéticos del animal, ingredientes probados en la dieta basal, dieta mezclada, <i>ad libitum</i> .
Animal / Periodo.	Considerar el tipo de animal para el que se usarán las determinaciones de la tasa de digestión.  Al menos dos réplicas por periodo de tiempo deben ser usadas (por animal) Insertar las bolsas en relación al tiempo de alimentación para cada animal y periodo. (Al mismo tiempo).
Incubación pre-ruminal	Empapar las bolsas en agua o buffer previo a la incubación.
Inserción de la bolsa	Insertar las bolsas en intervalos de tiempo específico y recolectarlas grupalmente.
Lavado post-ruminal	Enjuagar con agua corriente hasta que el flujo de agua sea claro (90 s/bolsa con manipulación moderada).
Tiempos de incubación	0 – 6 horas: 3 a 6 puntos de tiempo 6 – 24 horas: 3 a 6 veces >25 horas: 6 – 12 horas de intervalo.
Ingredientes estándar	Una bolsa por cada tiempo de incubación, con los ingredientes a probar.
Expresión de resultados.	Estimar la disponibilidad ruminal como (Goering y Van Soest, 1970; Orskov y Mcdonald, 1979).

#### **4.1.1. Animales canulados.**

Las características ideales de un donador de líquido ruminal son: debe tener buen comportamiento, debe ser dócil y estar libre de enfermedades. La cánula puede ser de diferentes materiales (flexibles o rígidas) la cánula debe medirse previo a la cirugía. El donador debe ser privado de alimento 24 horas antes y de agua 12 horas antes de la cirugía. El abordaje quirúrgico se realiza en la fosa paralumbar izquierda, previa anestesia del animal. Una vez canulado, los cuidados postquirúrgicos incluyen tratamiento antibiótico y limpieza y cuidado de la correcta cicatrización (Laflin y Gnad 2008).

#### **4.2. Técnicas de fermentación *in vitro*.**

Las técnicas de fermentación *in vitro* (**TFIV**) que involucran la incubación de sustratos con líquido ruminal han sido usadas extensamente para evaluar el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes. Las mediciones basadas en las TFIV complementan los análisis de composición química de laboratorio y por lo tanto ofrecen una alternativa rápida y menos costosa a la determinación de la degradabilidad de nutrientes *in vivo* (Rymer *et al.* 2005) además, la utilización de estas técnicas para reducir el número de animales experimentales, representa una ventaja cuando un gran número de tratamientos necesitan ser probados. Recientemente las TFIV han sido usadas para evaluar el potencial reducción de CH<sub>4</sub> (Bodas *et al.* 2012; Durmic *et al.* 2010).

La digestión de los alimentos puede ser estimada por métodos biológicos que simulan el proceso de la digestión. Algunos (métodos biológicos) están actualmente disponibles para determinar el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes. Estos son: La digestión con microorganismos ruminales del método (Tilley y Terry, 1963).

La técnica de Tilley y Terry, (1963) se convirtió en una herramienta importante para la evaluación de los alimentos en rumiantes, es usada ampliamente por su conveniencia, particularmente cuando se requiere probar a gran escala ingredientes o aditivos. Este método es ocupado en muchas evaluaciones de forrajes en el laboratorio. Implica dos fases en los que los forrajes son sujetos a 48 horas de fermentación, primero en una solución de líquido ruminal y buffer, seguido de una

digestión con pepsina en una solución ácida. Este método fue modificado por (Goering y Van Soest, 1970) en dicha modificación el residuo después de las 36 o 48 horas de incubación es tratado con solución neutro detergente para estimar la degradabilidad de la FDN a las 36 o 48 horas (Getachew *et al.* 1998).

Medir adecuadamente la degradabilidad de la FDN tiene implicaciones prácticas para la alimentación. Dadas las altas demandas nutricionales de los animales en sistemas intensivos (por ejemplo vacas lecheras en lactación temprana) una gran cantidad de concentrados son utilizados para aumentar la energía de la dieta, lo que compromete los niveles de Fibra Detergente Neutro Físicamente Efectiva (**FDNfe**) presentes en la dieta. La fibra físicamente efectiva es necesaria en las dietas para estimular la masticación, el suministro de buffer salival, la motilidad ruminal y el mezclado del contenido, todo ello favorece que se mantenga un ecosistema ruminal sano (Humer *et al.* 2017; Zebeli *et al.* 2012). El concepto de FDNfe fue creado por (Mertens 1997), este toma en cuenta las características de composición y el tamaño de la partícula para calcular su efectividad.

Czerkawski y Breckenridge, (1975) desarrollaron un sistema que involucraba registrar el desplazamiento de un émbolo en una jeringa de cristal por el gas producido durante la fermentación, este fue la base para el desarrollo de la técnica de Menke *et al.* (1979). La “Técnica de la jeringa” fue originalmente desarrollada para determinar la fermentación de los alimentos a las veinticuatro horas de incubación, luego (Blümmel y Ørskov, 1993) modificaron la técnica, incubando las jeringas en baño maría, en lugar del incubador rotatorio. Registrando la producción de gas a intervalos de tiempo más frecuentes, la cinética de fermentación pudo ser determinada.

La necesidad de proveer de un medio adecuado para el desarrollo de las comunidades de microorganismos, así como la diversificación de las técnicas de evaluación de la digestibilidad llevó a Czerkawski y Breckenridge, (1977) a desarrollar un enfoque diferente. Ya que los sistemas de cultivo simple no lograban simular suficientemente las condiciones del rumen (todos ellos podían solo simular a corto plazo dichas condiciones, frecuentemente las concentraciones de

protozoarios disminuyen o desaparecen todos juntos.). Así surgió RUSITEC, que es un sistema semi-contínuo de cultivo que permite extender el tiempo de las fermentaciones, cuando se estabiliza la fermentación puede ser mantenida de manera indefinida (hasta 49 días) con parámetros muy similares a los de los donadores, ya que no acumula gas ni metabolitos secundarios, permite simular las condiciones del rumen sin que haya limitaciones del crecimiento, además de permitir el muestreo del líquido en diferentes periodos de tiempo y es posible correr cuatro réplicas de manera simultánea. (Czerkawski y Breckenridge 1977).

Wilkins (1974) describió una aproximación diferente para la medición de la cinética de fermentación *in vitro*, (Figura 6) en su técnica la fermentación se llevó a cabo en un recipiente sellado que contenía líquido ruminal, buffer y sustrato. Un transductor de presión fue usado para medir la acumulación de gas en el *headspace* (el espacio “libre” en la cabeza del recipiente) (Figura 7). En la configuración más simple de este sistema, la presión del *headspace* es medida manualmente como lo descrito por (Theodorou *et al.* 1994), cuando la presión de gas es liberada, las muestras de gas son colectadas para el análisis de concentración de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub> (Tekippe *et al.* 2013) (Figura 8).

En la década de los 1990's nuevos sistemas fueron elaborados para la evaluación de la fermentación ruminal, el primer sistema automático de medición fue desarrollado por (Pell y Schofield, 1993), realizaron mediciones de la acumulación de gas en tiempo real, las cuales permitieron un mejor entendimiento de la cinética de fermentación de un amplio rango de sustratos (Groot *et al.* 1996). Durante el desarrollo de estos sistemas, se volvió cada vez más claro que el aumento de la presión (aunado al contenedor dónde se llevaba a cabo) podía afectar los productos finales de la fermentación, así como la velocidad y el alcance de la misma. (Tagliapietra *et al.* 2010). Algunos sistemas más avanzados liberan y colectan periódicamente el gas, con una válvula selenoide, evitando con ello la acumulación y aumento de la presión de gas (Davies *et al.* 2000; Cone *et al.* 2002).

Recientemente Muetzel *et al.* (2014) desarrollaron un sistema automático, en el que la producción de gas es monitoreada en tiempo real mediante sensores de presión;

la porción de dicho gas que corresponde a CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub> es medida en el gas ventilado mediante cromatografía de gas.

*Cuadro 2 Recomendaciones generales para técnicas de digestibilidad in vitro. Tomado de (Yáñez-Ruiz et al. 2016).*

Donadores	Los animales donadores de líquido ruminal deberían ser tres o más individuos (mínimo dos), de la misma especie.
Número de repeticiones	Mínimo tres repeticiones por tratamiento en un bloque.
Dieta	Los animales donadores deberían ser alimentados con la misma dieta que la que se utilizará para la incubación (o similar en composición de nutrientes).
Adaptación	Se deberá coleccionar inóculo solo de animales adaptados al tratamiento por al menos dos semanas.
Colección de inóculo ruminal.	La recolección debe ser antes de la comida, a menos que el diseño experimental requiera un régimen de muestreo diferente.
Conservación y procesamiento.	Idealmente mantener el inóculo bajo condiciones anaeróbicas a 39°C y debe usarse en un periodo de una hora. Preservar a 0°C hasta 6 horas o antes de ser procesada. O en nitrógeno líquido. Filtrese con gasa con un diámetro de 250 micrómetros.
Sustrato	Use un rango de sustratos para la investigación de aditivos. Incluya blancos sin sustrato y tratamiento para controlar la variabilidad y como referencia para comparar entre laboratorios.
Composición del buffer (Relación	No utilice un único buffer. Para todas las incubaciones ajuste la concentración de bicarbonato para mantener un pH objetivo para el cultivo. La concentración no debe ser mayor de 80mM



inóculo : Medio)	(Ajuste la relación Inóculo - Medio) dependiendo de la duración de la incubación y la frecuencia del muestreo.
Duración de la incubación.	Ajuste la duración de acuerdo a la composición y tamaño de partícula del sustrato, pasado en el tiempo de retención del rumen <i>In vivo</i> .
Unidades de medición del gas.	Determinar CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> cuando la presión de gas esté liberada. Preferentemente expresar los datos de manera relativa al sustrato degradado (materia seca, materia orgánica, FDN) Si esto no es posible, los datos deberán ser expresados respecto a la producción total de gas, CO <sub>2</sub> o producción total de AGV's.
Detalles técnicos que deben ser reportados.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Número de animales usados para obtener el inóculo.</li> <li>• Composición de la dieta (de los animales donadores y del sustrato).</li> <li>• Tiempo de colección respecto a la alimentación.</li> <li>• Composición del gas en el <i>headspace</i>.</li> <li>• Tamaño de los poros utilizados para filtrar el líquido ruminal.</li> <li>• Composición del buffer y el medio</li> <li>• Condiciones de almacenaje del inóculo ruminal, tanto temperatura como tiempo, desde la recolección a la inoculación.</li> <li>• Proporción del medio y el líquido ruminal.</li> <li>• Procesos a los que se sometió el sustrato.</li> <li>• Frecuencia de muestreos de gas y mediciones de CH<sub>4</sub>.</li> </ul>

## 5. Justificación:

Con base a lo anterior y debido a que no existen evaluaciones de extractos acuosos y aceites esenciales de ajo, canela, romero y eucalipto en rumiantes, se realizó una

prueba de producción de gas *in vitro* para evaluar diferencias en los parámetros de fermentación ruminal, digestibilidad de la materia seca y producción de metano.

## **6. EFECTO DE ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS ACUOSOS DE AJO, CANELA, ROMERO Y EUCALIPTO EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y PRODUCCIÓN DE METANO.**

EFFECT OF ESSENTIAL OILS AND AQUEOUS EXTRACTS OF GARLIC, CINNAMON, ROSEMARY AND EUCALYPTUS ON RUMINAL FERMENTATION AND METHANE PRODUCTION.

Palabras clave: Ovinos, Rumen, Fitoquímicos, Metano.

Bajo la asesoría de Dr Luis Corona Gochi y Dr Efrén Ramírez Bribiesca.

### **7. Materiales y métodos.**

El protocolo fue aprobado por el CICUAE - FMVZ - UNAM (Comité Institucional para el Cuidado y uso de los Animales de Experimentación) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. De acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

#### **7.1. Lugar de desarrollo de la prueba:**

La prueba de producción de gas se llevó a cabo en Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), ubicado en San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, Ciudad de México. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Bromatología del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para su posterior análisis.

#### **7.2. Diseño experimental y tratamientos**

Se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con arreglo factorial 4 (especies): (Ajo (A) Canela (C), Romero (R), Eucalipto (EU)) x 2 tipos de presentación (Aceite esencial, Extracto acuoso (A), (E)) + dos controles; (Testigo (T) y Monensina a 30ppm (MON)). El criterio de bloqueo fue la corrida (cuatro), utilizando 4 repeticiones en las dos primeras y 3 repeticiones en las dos subsecuentes para un total de 14 repeticiones. Las variables se analizaron con el procedimiento MIXED (SAS, 2004), la comparación de medias se realizó con análisis Tukey mediante los

siguientes contrastes: A Vs E, AA Vs EA, AC Vs EC, AEU Vs EEU, AR Vs ER, T Vs A, T Vs E, MON Vs A, MON VS E de acuerdo al siguiente modelo (Cochran y Cox, 1992).

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_l + \epsilon_{ijkl}$$

Dónde  $Y_{ijkl}$  es la variable respuesta en el i-esimo tipo de especie, j-esimo tipo de presentación, en la repetición k-esima de la corrida l-esima,  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto del tipo de especie a nivel i,  $\beta_j$  es el efecto del tipo de presentación al nivel j,  $(\alpha\beta)_{ij}$  es el efecto de la interacción Tipo de especie \* Tipo de extracto en el nivel i,j,  $\gamma_l$  es el efecto de bloque,  $\epsilon_{ijkl}$  es el error aleatorio.

### **7.3. Fitoquímicos.**

Se emplearon aceites esenciales de: Ajo (AA) Canela (AC), Romero (AR), Eucalipto (AEU), así como el extracto acuoso de Canela (EC) donados por el laboratorio Rosa Helena Dueñas <sup>TM</sup>. Para complementar el diseño experimental, se aislaron en el laboratorio de Bromatología II del DNAB de la FMVZ extractos acuosos de eucalipto y romero, utilizando una de las metodologías descrita por (Fernández-Agulló *et al.* 2015). Se utilizó una proporción de material vegetal - solventes de 1 a 10. Los solventes utilizados fueron etanol y agua destilada en una proporción 5:50 respectivamente. Las constantes de extracción fueron: T° constante de 50°C, agitación con barra magnética a 2000 RPM, durante 90 minutos. Después de obtenido el extracto, el material vegetal fue filtrado al vacío con un embudo de Buchner y un kitasato.

Dicho extracto filtrado fue después evaporado para eliminar el etanol en un rotavapor marca Buchi (App Nr. 182468, Suiza) con las siguientes constantes: 60°C, 70 RPM, durante un aproximado de 30 minutos, hasta la evaporación de la mitad del volumen inicial (Figura 4.)



Figura 4 Proceso de evaporación utilizando un rotavapor Buchi® para la concentración de los extractos acuosos.

El extracto acuoso de ajo fue preparado con extracto seco de ajo (muestra WWP00-167-D) proveniente del laboratorio ADEGERMEX. Se utilizaron 0.9g de dicho extracto para ser disuelto en 100 mL de agua. Se calentó a una T° de 50°C con agitación magnética a 2000 RPM, durante 30 minutos para homogenizar. (Tocmo *et al.* 2016).

Los fitoquímicos fueron adicionados a una dosis de 900 mg/L de inóculo ruminal.



Figura 5 Ovinos donadores de contenido ruminal.

#### **7.4. Análisis químicos.**

La composición nutricional del sustrato fue determinada mediante el método AOAC (2016) para las determinaciones: Materia seca (MS, método 934.01 AOAC 2005), proteína cruda

(PC, método 2001.11; AOAC 2005) extracto etéreo (EE, método 920.39 AOAC 2005), cenizas (Cen método 942.05 AOAC 2008) fibra cruda (FC método 962.09 AOAC 2005) y análisis de las fracciones de fibra, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van Soest et al. 1991)

### **7.5. Producción de gas *in vitro*.**

Se colectó contenido ruminal de tres ovinos Pelibuey canulados en rumen (Figura 5), los cuales fueron alimentados con una dieta compuesta por un 50% concentrado comercial para ovinos, 20% alfalfa y 30% ensilado de maíz (MS) y agua *ad libitum*. El líquido ruminal se colectó por la mañana (con los animales en ayuno), una vez colectado fue llevado de inmediato al laboratorio en termos, conservando las condiciones de anaerobiosis y temperatura (39 °C). En el laboratorio, el contenido ruminal de los tres animales fue filtrado y mezclado a través de 8 capas de gasa. Posteriormente se mezcló con una solución mineral reducida en proporción de 1:9 v/v, obteniendo así el inóculo ruminal (Theodorou *et al.* 1994) las soluciones minerales fueron preparadas de acuerdo a (Menke, Raab y Steingass, 1979). Se pesaron 0.5 g de sustrato (50% concentrado comercial para ovinos, 20% alfalfa y 30% ensilado de maíz (MS)) y se colocaron en frascos de vidrio ámbar con capacidad de 125 mL. Posteriormente se agregaron 100 mL de inóculo ruminal bajo un flujo continuo de CO<sub>2</sub>. Los frascos se cerraron herméticamente con tapones de goma y anillos de aluminio y se introdujeron en un baño maría a 39°C. (Figura 6)



Figura 6 Técnica de producción de gas in vitro.

La presión de gas ( $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) se registró a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, y 72 h post-incubación, utilizando un manómetro digital (Traceable®, Fisher Scientific, USA) (Figura 7)



Figura 7 Medición de producción de gas.

### **7.6. Determinación indirecta de $\text{CH}_4$ y colección de gas para análisis en cromatógrafo.**

Dos repeticiones extras fueron añadidas al experimento, ambas para la captación del gas total, el cual fue extraído completamente del frasco con una jeringa de 60



mL, a las 6, 12, 18, 24, 48 y 72 horas de incubación para ser posteriormente inyectado en dos tipos de frascos diferentes.

El frasco tipo 1 contuvo 38 mL de una solución saturada de cloruro de sodio. La solución fue preparada con: 350 g de sal común, 5 mL de anaranjado de metilo al 0.1% (indicador del pH), CBP 1 L (agua destilada) todo ello ajustado a un pH de 2 con ácido clorhídrico (**HCL**) 1 N, estos frascos fueron utilizados para preservar la composición del gas muestreado, para su posterior análisis en cromatógrafo.

El frasco tipo 2 contuvo una solución de hidróxido de potasio (**KOH**) a una concentración 1 Molar, estos frascos fueron utilizados para fijar el  $\text{CO}_2$  y separar con ello el  $\text{CH}_4$  y el  $\text{H}_2$  producido durante la fermentación. (Lombardi *et al.* 2011)



Figura 8 Muestreo para determinación de  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2$ .

El procedimiento para la obtención de la muestra consistió en tomar todo el gas del frasco ámbar con la jeringa (Figura 8), posteriormente introducirla a un frasco tipo 1 completamente lleno y boca abajo e inyectar 2 mL por tiempo de muestreo. Las muestras se mantuvieron boca abajo todo el tiempo y fueron conservadas en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  para su posterior análisis en el cromatógrafo de gases.

La otra repetición extra fue utilizada para una medición indirecta de metano y gases menores (hidrógeno) con una solución de hidróxido de potasio (**KOH**) a una



concentración 1 Molar. El gas fue vaciado en su totalidad del frasco ámbar y se inyectó en frascos con 25mL de la solución de KOH, de manera tal que el gas inyectado fuera filtrado por la solución que fija el CO<sub>2</sub> (Lombardi *et al.* 2011). Una vez fijado se midió el gas que regresaba a la jeringa (CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>) y se registró el total de gas producido y el retornado a la jeringa.

### **7.7. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca y materia orgánica.**

A las 72 h post-incubación se evaluó la degradación de materia seca (MS residual) y de materia orgánica (**MO**) para estimar la digestibilidad *in vitro* de la MO (DIVMO) y la degradación ruminal. A continuación, el contenido de los frascos ámbar fue filtrado individualmente utilizando rodajas de papel filtro (Waltham No. 41) con ayuda de una bomba de vacío. Ya filtrada la rodaja se introdujo en una estufa de aire forzado a 55° por 48 horas hasta alcanzar un peso constante.

### **7.8. Cinética ruminal.**

Las lecturas de presión (kg·cm<sup>-2</sup>) obtenidas se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal (Ørskov y McDonald, 1979)  $V_f = \text{Presión} / 0.019$  ( $R^2 = 0.988$ ). Una vez ajustados los datos con los valores registrados en los blancos, los datos de volumen de gas y tiempo de incubación obtenidos de la regresión se promediaron y se agruparon para obtener el volumen fraccional (**VF**) de carbohidratos de fermentación rápida (**FR**, de 0 a 8 h), de fermentación media (**FM**, de 10 a 30 h) y de los de fermentación lenta (**FL**, de 36 a 72 h). Y el volumen acumulado (**VA**).

Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (**Vmax**), fase de retardo (**L**) y tasa de producción de gas (**S**), se obtuvieron mediante el modelo logístico de (Pitt *et al.* 1999). La siguiente fórmula expresa el índice de contaminación atmosférica por forrajes, (**ICAF**)  $ICAF = (Vmax / MSD)$ . La cual proyecta la cantidad de gases que pueden ser emitidos a la atmósfera por cada gramo de materia seca degradada (**MSD**) de forraje, en este caso se utilizó para estimar que tratamiento podría ser el más contaminante.

## 8. Estimación de energía metabolizable (**EM**), ácidos grasos volátiles (**AGV's**), producción de masa microbiana. (**MM**), porcentaje de metano (**%CH<sub>4</sub>**) y Mililitros de metano por gramo de materia orgánica fermentada en rumen (mL CH<sub>4</sub>/g MOFR.)

La estimación de energía metabolizable (**EM**) (Kcal/ Kg MS), fue realizada de acuerdo a (Menke *et al.* 1979) como

$$\mathbf{EM}, = 0.1074 (\pm 0.00077) \mathbf{Pg} + 10.6 (\pm 0.076) \mathbf{PC} + 17.1 (\pm 0.29) \mathbf{EE} + 5.04 (\pm 0.086) \mathbf{ELN} - 0.098 (\pm 0.0037); (\text{MJ/kg, g/g}).$$

Donde **Pg** = Producción de gas a las 24 horas, **PC**=proteína cruda (g/g), **EE**=extracto etéreo (g/g). El resultado fue luego transformado a Kcal/Kg.

La estimación de ácidos grasos volátiles (**AGV's**) (mmol/200 mg MS) fue calculada de acuerdo a (Getachew, Makkar y Becker, 2002) como:

$$\mathbf{AGV's} (\text{mmol}/200 \text{ mg MS}) = 0.0222 \mathbf{Pg} - 0.00425.$$

Donde **Pg** = Producción de gas a las 24 horas.

La producción de masa microbiana (**MM**) fue calculada de acuerdo a la adecuación de (Salem 2012) sobre el trabajo de (Blümmel *et al.* 1997) como:

$$\mathbf{MM} (\text{mg/g MS}) = \text{mg } \mathbf{SAD} - (\text{ml gas} \times 2.2 \text{ mg/ml})$$

Donde **SAD** = sustrato aparentemente degradado.

2.2 mg/ml es un factor estequiométrico el cual expresa los mg de C, H y O requeridos por los **AGV's** asociados con la producción de un ml de gas.

El porcentaje de metano (**%CH<sub>4</sub>**) fue calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$\mathbf{\%CH_4} = (\text{mL de gas no fijados en KOH} \times 100) / \text{mL de gas totales.}$$

La cantidad de mililitros de metano sobre gramo de materia orgánica fermentada en rumen (**mL de CH<sub>4</sub>/g MOFR**) fue calculado a partir de la siguientes fórmulas:

$$(\text{mL de CH}_4 = \frac{\% \text{ CH}_4 \times \text{VA } 72\text{h}}{100}) / \text{g MOFR}.$$

$$\text{MOFR} = \text{MSD} - \text{Cen}.$$

Dónde %CH<sub>4</sub> es el porcentaje de metano, VA<sup>72h</sup> es el volumen acumulado a 72 horas, MOFR es la materia orgánica fermentada en rumen, MSD son los gramos de materia seca degradada y Cen los gramos de ceniza.

## 9. Resultados.

En el cuadro 3 se observa la composición de la dieta base experimental.

Alimento	Composición
%M.S.	99.3
%Humedad	0.7
%P.C. (N*6.25)	12.4
%E.E.	4.4
%Cenizas	9.2
%F.C.	15.5
%E.L.N.	57.8
T.N.D.	74.2
E.D. Kcal/Kg	3273.3
E.M. Kcal/Kg	2683.8
%Ca base seca	0.7
%P base seca	0.4
%FDN	43.9
%FDA	21.8

*Cuadro 3 Composición nutricional de la dieta experimental (MS)*

Como se observa en el Cuadro 4 y 5, se encontró interacción entre la presentación y especie (P\*E) para todas las variables, excepto para la fase Lag (L). Los aceites esenciales (A) disminuyeron ( $P < 0.05$ ) en general los parámetros de fermentación ruminal y la DIVMS en comparación con los extractos acuosos (E) y los tratamientos testigo (T) y con monensina (MON).

Los aceites esenciales (A) disminuyeron ( $P < 0.05$ ), la concentración de AGV's excepto AEU (Cuadro 5), respecto a los extractos acuosos (E) y la producción de masa microbiana (**MM**) disminuyó ( $P < 0.05$ ) para los aceites esenciales de ajo (AA) y canela (AC), respecto al resto de los tratamientos. La energía metabolizable (**EM**) disminuyó ( $P < 0.05$ ) para los aceites esenciales de ajo (AA) y Canela (AC) con respecto a los otros tratamientos). Los (A) disminuyeron ( $P < 0.05$ ) el % de CH<sub>4</sub> en 13.75% y 13.5% respecto a (MON) y (T) respectivamente.

La emisión de CH<sub>4</sub> por gramo de materia orgánica fermentada en rumen (**mLCH<sub>4</sub>/g MOFR**) fue menor para el aceite esencial de canela (AC), seguido del aceite de romero (AR) y el aceite de ajo (AA).

**Cuadro 4 Efecto de aceites esenciales (E) y extractos acuosos(A) de *Allium sativum* (A), *Cinnamomum verum* (C), *Eucalyptus globulus* (EU) y *Rosmarinus officinalis* (R) en la fermentación ruminal, DIVMS e ICAF con la técnica de producción de gas *in vitro*.**

	VAR	FR (mL/g)	FM (mL/g)	FL (mL/g)	Vm (mL/g-1)	S (h-1)	L (h)	DIVMS <sup>72h-1</sup> %	ICAF (mL/gddm)
Aceites esenciales.	AA	81.5 <sup>c</sup>	101.3 <sup>b</sup>	60.0 <sup>bcd</sup>	445.0 <sup>b</sup>	0.034 <sup>b</sup>	5.9	50.5 <sup>c</sup>	885.5 <sup>a</sup>
	AC	55.72 <sup>d</sup>	70.81 <sup>c</sup>	54.47 <sup>c</sup>	340.9 <sup>c</sup>	0.028 <sup>c</sup>	5.6	47.7 <sup>c</sup>	710.6 <sup>b</sup>
	AEU	111.1 <sup>a</sup>	139.1 <sup>a</sup>	68.6 <sup>abc</sup>	586.8 <sup>a</sup>	0.037 <sup>abc</sup>	5.5	61.7 <sup>b</sup>	959.0 <sup>a</sup>
	AR	95.9 <sup>bc</sup>	105.7 <sup>bc</sup>	59.1 <sup>cd</sup>	474.5 <sup>bc</sup>	0.039 <sup>a</sup>	5.7	56.8 <sup>bc</sup>	841.5 <sup>ab</sup>
Extractos acuosos.	EA	105.1 <sup>ab</sup>	134.5 <sup>a</sup>	71.5 <sup>a<sup>b</sup></sup>	576.0 <sup>a</sup>	0.035 <sup>ab</sup>	5.7	70.6 <sup>a</sup>	820.0 <sup>ab</sup>
	EC	106.6 <sup>ab</sup>	137.2 <sup>a</sup>	72.3 <sup>a</sup>	586.7 <sup>a</sup>	0.034 <sup>ab</sup>	5.8	68.1 <sup>a</sup>	864.3 <sup>a</sup>
	EEU	108.1 <sup>ab</sup>	138.8 <sup>a</sup>	73.6 <sup>a</sup>	593.8 <sup>a</sup>	0.035 <sup>ab</sup>	5.7	67.9 <sup>a</sup>	880.9 <sup>a</sup>
	ER	108.2 <sup>ab</sup>	141.5 <sup>a</sup>	73.2 <sup>a</sup>	599.3 <sup>a</sup>	0.035 <sup>ab</sup>	5.6	68.4 <sup>a</sup>	879.9 <sup>a</sup>
Control	Presentación	104.7 <sup>ab</sup>	130.4 <sup>a</sup>	66.9 <sup>abc</sup>	559.1 <sup>a</sup>	0.035 <sup>ab</sup>	5.8	69.2 <sup>a</sup>	821.8 <sup>ab</sup>
	MON	111.1 <sup>a</sup>	139.1 <sup>a</sup>	71.8 <sup>abc</sup>	597.3 <sup>a</sup>	0.035 <sup>abc</sup>	5.8	69.7 <sup>a</sup>	858.7 <sup>a</sup>
EEM	EEM	3.3	4.3	2.6	15.4	0	0.3	1.1	33.7
Contrastes	Bloque	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.085	<0.0001	<0.0001
	Presentación	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.9222	0.9521	<0.0001	0.4592
	Especie	<0.0001	<0.0001	0.0056	<0.0001	<0.0001	0.9139	<0.0001	<0.0001
	P * E	<0.0001	<0.0001	0.0278	<0.0001	<0.0001	0.9316	<0.0001	<0.0001
	A Vs E	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.9472	0.9494	<0.0001	0.6119
	AA VS EA	<0.0001	<0.0001	0.0022	<0.0001	0.6035	0.6786	<0.0001	0.1716
	AC VS EC	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.7517	<0.0001	0.0016
	AEU VS EEU	0.5171	0.9568	0.1837	0.7557	0.0691	0.6704	<0.0001	0.1039
	AR VS ER	0.0087	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.004	0.8409	<0.0001	0.4224
	Control VS A	<0.0001	<0.0001	0.0307	<0.0001	0.374	0.7509	<0.0001	0.4686
	Control VS E	0.5268	0.1201	0.0502	0.0846	0.3969	0.7815	0.7081	0.2963
	MON VS A	<0.0001	<0.0001	0.0002	<0.0001	0.5976	0.7772	<0.0001	0.7993
MON VS E	0.2708	0.8146	0.7794	0.6306	0.6269	0.828	0.4233	0.9468	

Abreviaturas: FR = volumen fraccional de carbohidratos de fermentación rápida. FM = volumen fraccional de carbohidratos de fermentación media. FL = volumen fraccional de carbohidratos de fermentación lenta. Vm = volumen máximo de gas. S = tasa de producción de gas. L = tiempo de retraso (horas). DIVMS = % digestibilidad *in vitro* de la materia seca. ICAF = índice de contaminación atmosférica. % CH<sub>4</sub> = porcentaje de emisión de CH<sub>4</sub>. Bloque = Bloque experimental. Presentación = Aceite esencial o extracto acuoso. Especies = Ajo, Canela, Eucalipto, Romero. Px E = Interacción entre presentación y especie. Contrastes: A Vs E = Aceites Vs Extractos; AA Vs EA = Aceite de ajo contra extracto de ajo; AC Vs EC = Aceite de canela contra extracto de canela; AEU contra EEU = aceite de eucalipto contra extracto de eucalipto; AR Vs ER = aceite de romero contra extracto de romero; Control Vs A = Control contra aceites esenciales; Control Vs E = Control contra extractos acuosos; MON Vs A = Monensina Vs Aceites esenciales; MON Vs E = Monensina contra extractos acuosos. Los promedios dentro de la columna con diferentes superíndices (a-d) son diferentes (P <0.05), EEM = error estándar de la media.

**Cuadro 5 Efecto de aceites esenciales (A) y extractos acuosos (E) de *Allium sativum* (A), *Cinnamomum verum* (C), *Eucalyptus globulus* (EU) y *Rosmarinus officinalis* (R) en los parámetros: Energía Metabolizable (EM) Ácidos Grasos Volátiles (AGV's), producción de masa microbiana (MM), % de emisión de Metano (CH<sub>4</sub>%) y mL de Metano/g Materia Orgánica Fermentada en Rumen (CH<sub>4</sub>/g MOFR)**

	VAR	EM (Kcal/Kg MS)	AGV's (mmol/200 mg MS)	MM (mg/ g MS)	CH <sub>4</sub> %	mLCH <sub>4</sub> /g MOFR
Aceites esenciales.	AA	1385 <sup>c</sup>	2.95 <sup>c</sup>	192.20 <sup>c</sup>	37	750.92 <sup>abc</sup>
	AC	1377 <sup>d</sup>	1.99 <sup>d</sup>	102.5 <sup>d</sup>	36.62	594.74 <sup>c</sup>
	AEU	1395 <sup>ab</sup>	4.05 <sup>a</sup>	278.23 <sup>a</sup>	43.71	976.30 <sup>a</sup>
	AR	1388 <sup>bc</sup>	3.28 <sup>bc</sup>	211.95 <sup>bc</sup>	37.37	726.81 <sup>bc</sup>
Extractos Acuosos.	EA	1393 <sup>ab</sup>	3.86 <sup>a</sup>	241.31 <sup>abc</sup>	42.91	797.86 <sup>abc</sup>
	EC	1394 <sup>ab</sup>	3.90 <sup>a</sup>	251.62 <sup>ab</sup>	46.97	915.08 <sup>ab</sup>
	EEU	1394 <sup>ab</sup>	3.97 <sup>a</sup>	257.82 <sup>ab</sup>	47.08	924.30 <sup>ab</sup>
	ER	1396 <sup>a</sup>	4.00 <sup>a</sup>	260.09 <sup>ab</sup>	42.5	902.71 <sup>ab</sup>
Control	T	1393 <sup>ab</sup>	3.79 <sup>ab</sup>	237.62 <sup>abc</sup>	44.75	850.16 <sup>ab</sup>
	MON	1395 <sup>a</sup>	4.03 <sup>a</sup>	260.39 <sup>ab</sup>	44.9	886.22 <sup>ab</sup>
EEM	EEM	0.001	0.06	5.5	1.3	0.002
Contrastes	Bloque	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.04	<0.0001
	Presentación	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.03	<0.0001
	Especie	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.45	<0.0001
	P * E	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.7	0.0001
	A Vs E	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0258	0.0009
	AA VS EA	<0.0001	<0.0001	0.0042	0.366	0.5165
	AC VS EC	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0832	<0.0001
	AEU VS EEU	0.7255	0.6172	0.2284	0.7995	0.4701
	AR VS ER	0.0002	<0.0001	0.005	0.1138	0.0161
	T VS A	<0.0001	<0.0001	0.0023	0.1247	0.1256
	T VS E	0.5056	0.2665	0.2599	0.9829	0.5435
	MON VS A	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0763	0.0315
MON VS E	0.5056	0.4535	0.5659	0.7178	0.0447	

Abreviaturas: Var =Variable. EM = Energía metabolizable. AGV's = Ácidos grasos volátiles. MM = Producción de masa microbiana. % CH<sub>4</sub> = porcentaje de emisión de CH<sub>4</sub>. mLCH<sub>4</sub>/g MOFR = mililitros de metano por gramo de materia orgánica fermentada en rumen. Tipos de extracto = (A) = aceite esencial o (E) = extracto acuoso. Tratamientos: A= Ajo, C = Canela, E= Eucalipto, R = Romero, T = Testigo, MON = Monensina, EEM = Error estándar de la media. \*P<0.001 \*\*P<0.05. Contrastes: A Vs E = Aceites Vs Extractos; AA Vs EA = Aceite de ajo contra extracto de ajo; AC Vs EC = Aceite de canela contra extracto de canela; AEU contra EEU = aceite de eucalipto contra extracto de eucalipto; AR Vs ER = aceite de romero contra extracto de romero; Control Vs A = Control contra aceites esenciales; Control Vs E = Control contra extractos acuosos; MON Vs A = Monensina Vs Aceites esenciales; MON Vs E = Monensina contra extractos acuosos. Los promedios dentro de la columna con diferentes superíndices (a-d) son diferentes (P <0.05), EEM = error estándar de la media.

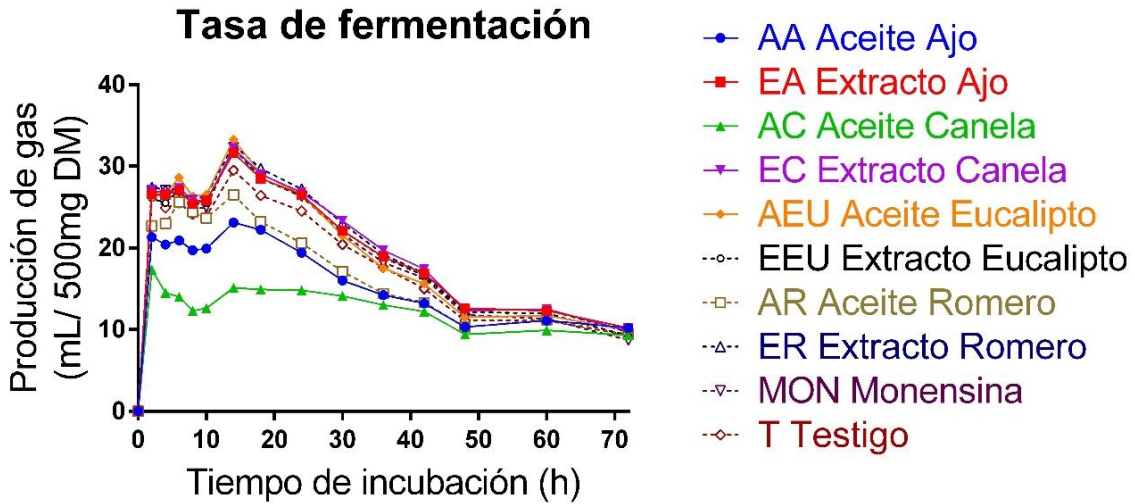


Figura 9. Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos sobre la tasa de fermentación in vitro (mL de gas/500mg M.S.) AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, AR=Aceite de Romero, ER=Extracto de Romero, MON=Monensina, T=Testigo.

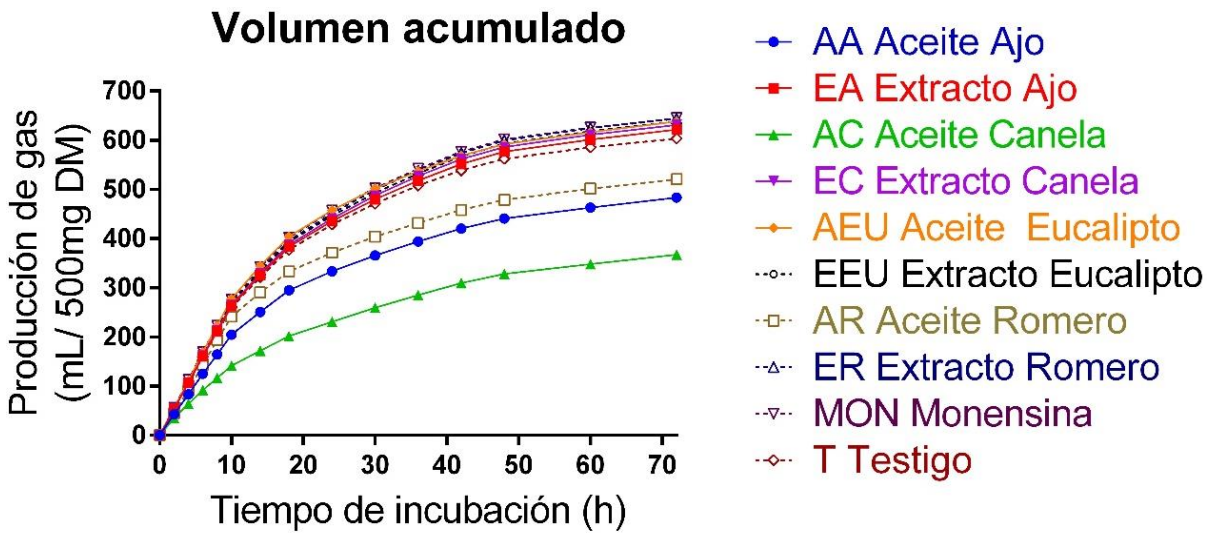


Figura 10 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos sobre el volumen de gas acumulado in vitro. (mL de gas/500mg M.S.) AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, T=Testigo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, MON=Monensina, AR=Aceite de Romero, ER=Extracto de Romero.

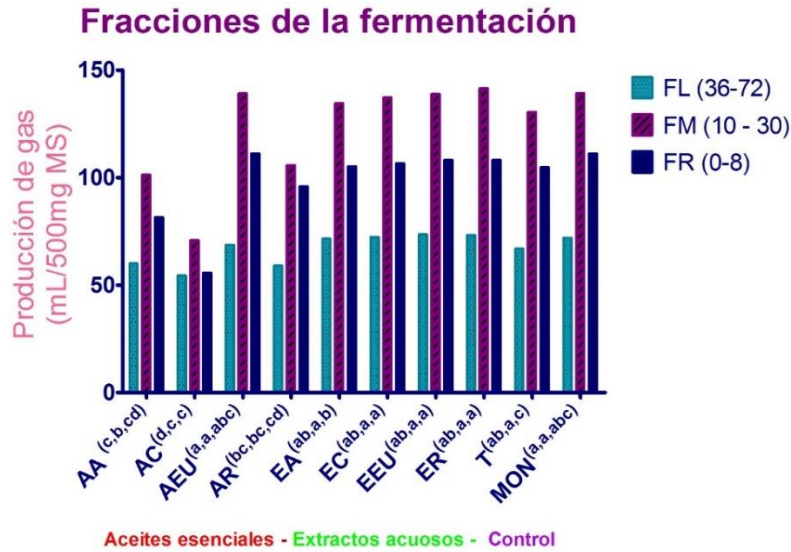


Figura 11 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en las fracciones de la fermentación (mL de gas/500mg M.S.) Abreviaturas: AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, AR = Aceite de Romero, ER = Extracto de romero, T=Testigo, MON=Monensina. FR = Fracción de fermentación rápida, FM = Fracción de fermentación media, FL = Fracción de fermentación lenta. \*Superíndices FL, FM, FR, <sup>(a-d)</sup> son diferentes (P<0.05).

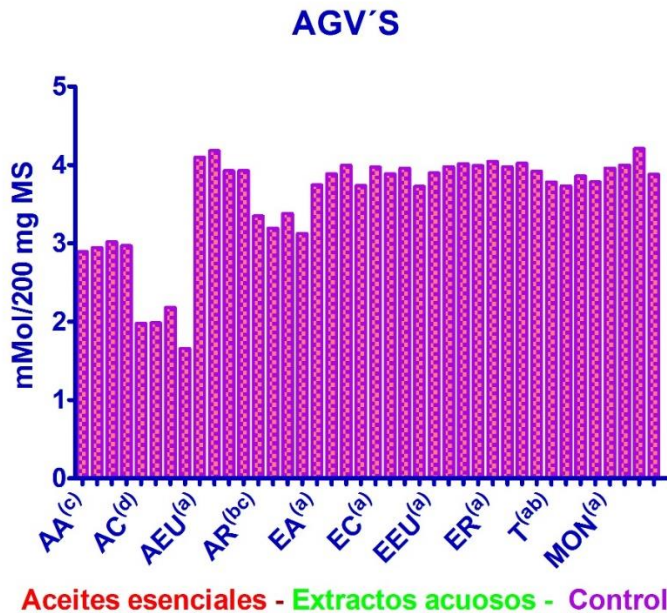


Figura 12 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la producción de AGV's (mmol/200mg M.S.) Abreviaturas: AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, AR = Aceite de Romero, ER = Extracto de romero, T=Testigo, MON=Monensina. Calculado como (Getachew et al. 2002) \*Superíndices <sup>(a-d)</sup> son diferentes (P<0.05).



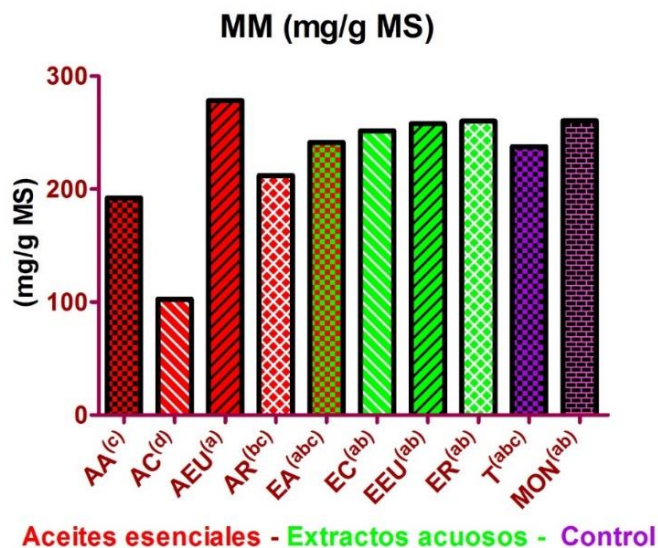


Figura 13 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la producción de masa microbiana (mg/g M.S.). Abreviaturas: AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, AR = Aceite de Romero, ER = Extracto de romero, T=Testigo, MON=Monensina. Calculado como (Salem 2012) \*Superíndices <sup>(a-d)</sup> son diferentes ( $P<0.05$ ).

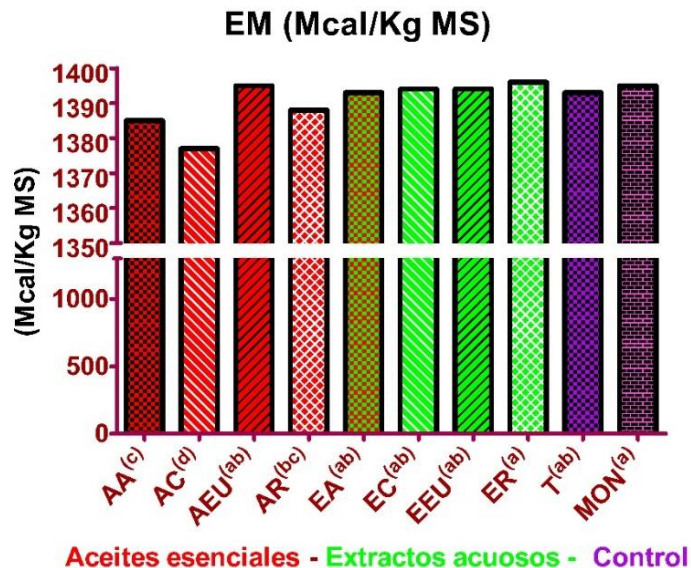
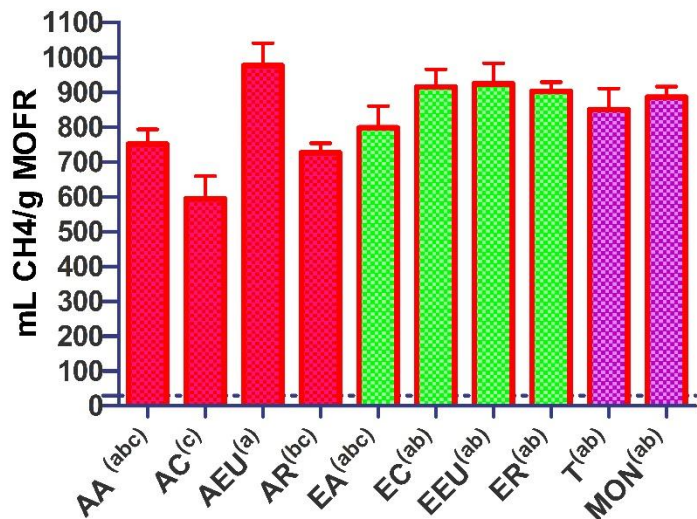


Figura 14 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la Energía Metabolizable (Mcal/Kg M.S.). Abreviaturas: AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, AR = Aceite de Romero, ER = Extracto de romero, T=Testigo, MON=Monensina. Calculado como (Menke, K. H. et al. 1979) \*Superíndices <sup>(a-d)</sup> son diferentes ( $P<0.05$ ).

# mL CH<sub>4</sub>/g MOFR



## Aceites esenciales - Extractos acuosos - Control

Figura 15 Efecto de la adición de aceites esenciales y extractos acuosos en la emisión de metano / gramo de materia orgánica fermentada en rumen (mL CH<sub>4</sub>/g MOFR) Abreviaturas: AA=Aceite de Ajo, EA=Extracto de Ajo, AC=Aceite de Canela, EC=Extracto de Canela, AEU=Aceite de Eucalipto, EEU=Extracto de Eucalipto, AR = Aceite de Romero, ER = Extracto de romero, T=Testigo, MON=Monensina. \*Superíndices <sup>(a-d)</sup> son diferentes (P<0.05).

## 10. Discusión.

El efecto inhibitorio en la fermentación provocado por los aceites esenciales (A) se puede explicar debido a la naturaleza química de los mismos, los cuales se ha reportado, son complejas mezclas de metabolitos secundarios de plantas, con una composición altamente variable, sin embargo su mecanismo de acción contra microorganismos es difícil de determinar y aún está pobremente entendido (Cobellis *et al.* 2016). Se cree que debido a su naturaleza hidrofóbica y afinidad por los lípidos, los A, pueden destruir la membrana citoplasmática bacteriana directamente o pueden dañar la proteína de las membranas, incrementando la permeabilidad citoplasmática o dejando salir algunos constituyentes del citoplasma mismo y eventualmente conducir a la lisis celular (Hart *et al.* 2008).

De manera particular el aceites esencial de Ajo (AA), cuyo compuesto activo más abundante llamado alicina, está presente entre el 1 y el 5 % del peso seco de la planta (Patra 2012) y el aceite esencial de canela (AC), cuyo principal compuesto es el cinamaldehído, presente entre el 60 al 75%, junto a un 4 a 10% de fenoles, principalmente eugenol e hidrocarburos (Gopu *et al.* 2008) ambos aceites disminuyeron ( $P < 0.05$ ) el volumen fraccional de fermentación rápida (FR) y media (FM) (Figura 10), el volumen máximo de gas producido ( $V_{max}$ ) la DIVMS con comparación con los aceites esenciales de Eucalipto (AEU), en el que se han identificado hasta 9 compuestos, siendo el 1,8-cineol, p-cimeno y alfa-pineno sus principales constituyentes. (Cobellis *et al.* 2016) (Knezevic *et al.* 2016) Y el aceite esencial de Romero (AR) en el que se han identificado como principales fitoquímicos al ácido rosmarínico y el ácido carnósico. (Rodríguez-Rojo *et al.* 2012).

El índice de contaminación atmosférica por forrajes (ICAF) fue menor ( $P < 0.05$ ) para el aceite esencial de canela (AC) lo que indica que es el fitoquímico que tiene la menor relación de volumen máximo liberado sobre la DIVMS.

Los bulbos intactos del ajo poseen los compuestos sulfurados llamados S-Alkanil – L – cistein sulfóxido y S-Alicistein sulfóxido Están presentes entre el 1 y el 5 % del peso seco de la planta. Sin embargo, cuando las células son dañadas, la enzima alinasa libera y convierte dichos compuestos en otros componentes volátiles y reactivos llamados Tiosulfatos (Patra 2012). De acuerdo a lo reportado por (Dewi *et al.* 2017) los extractos acuosos pueden contener N-acetilcisteina (NAC), cisteinil-alanina, fenol-2-2-benzoxazolil, los aceites esenciales diallildisulfido (DADS), dialliltrisulfido (DATS) y D-limoneno. En múltiples estudios ha sido usado como antibiótico natural y como modulador de la fermentación ruminal (Busquet, *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2005; Zhu, *et al.*, 2012; Patra y Yu, 2015).

En el presente trabajo se encontraron disminuciones en la DIVMS y  $CH_4$  para (AC) y (AA), resultado que concuerda con otros estudios (Jahani-Azizabadi *et al.* 2011; Patra y Yu 2015). En el primer estudio se probaron diferentes aceites esenciales en una dieta 80% forraje, 20% concentrado. Se encontraron efectos de disminución significativos ( $P < 0.05$ ) para el volumen acumulado (VA) y la DIVMS, en el segundo

estudio se encontraron disminuciones en la producción total de gas, metano y DIVMS para (AA).

Patra y Yu, (2012) reportan una disminución lineal de CH<sub>4</sub> dependientes de la dosis para AEU y AA, así como un efecto de disminución lineal, para la degradación la materia seca (DMS) usando AEU. Utilizaron dosis equidistantes de 0.25g/L, 0.5g/L y 1g/L, lo que se concuerda con el presente trabajo en que la utilización de dosis altas de (A) tiene un efecto inhibitor de la fermentación ruminal.

Una disminución en la producción total de gas fue registrada para AC y AR, igualmente una disminución en la emisión de CH<sub>4</sub> y DIVMS para AC, AR y AEU datos que concuerdan con (Cobellis *et al.* 2016) donde se demostró que los A con compuestos como el Cinamaldehído, presente en AC tienen una actividad antimicrobiana más fuerte que aquellos A que contienen monoterpenos y fenoles, por ejemplo AEU, AR.

El tratamiento más eficaz para la disminución de CH<sub>4</sub> fue AA; Ferme *et al.* (2004) reportaron cambios en las comunidades metanógenas. Ellos identificaron en el AA (particularmente un compuesto llamado diallil disulfido) como el primer extracto de planta que actuaba selectivamente contra metanógenos y protozoarios (Anassori *et al.* 2011). Se ha sugerido que los compuestos organosulfurados encontrados en el aceite de ajo pueden inhibir directamente las arqueas metanógenas del rumen a través de una inhibición de la enzima 3- hidroxil-3-metil-glutaril coenzima A (**HMG-CoA**) reductasa (Busquet *et al.*, 2005).

Las arqueas metanogénicas tienen lípidos de membrana únicos que contienen glicerol unido por enlaces de éter a alcoholes isoprenoides de cadena larga, que no está presente en otros microorganismos del rumen (De Rosa *et al.*, 1986). La síntesis de las unidades isoprenoides en arqueas metanogénicas está catalizada por HMG-CoA reductasa (Busquet *et al.*, 2005).

Pocas son las investigaciones que utilizaron extractos acuosos. Debido a la naturaleza volátil de los compuestos presentes en los aceites esenciales; los que son extraídos con solventes o a temperaturas bajas pueden tener mayor

bioactividad que aquellos extraídos con vapor o agua (Hart *et al.* 2008). Por su parte, Patra, Kamra y Agarwal, (2010) encontraron que los compuestos bioactivos presentes en el ajo (A) eran más solubles en solventes orgánicos como el etanol y metanol, volviendo a los E menos efectivos que los A en reducir la producción de metano.

Los mayores componentes del aceite esencial de romero (AR) como los monoterpenos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, Canfeno, 1-8 Cineol, Alcanfor, Borneol, Acetato de bornilo, Verbenona, son conocidos por sus propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram + y Gram - (Jiang *et al.* 2011; Santoyo *et al.* 2005) además ha sido estudiada la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos y diterpenos contenidos en las hojas de romero (Carnasol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, carnosato de metilo y ácido rosmarínico) ha sido bien documentada. (Ibañez *et al.* 2003; Shan *et al.* 2005; Bozin *et al.* 2007) por su parte (Rodríguez-Rojo *et al.* 2012) encontraron que la selección del solvente con el que se realizan las extracciones de los fitoquímicos cambian su composición, los extractos acuosos (E) (ricos en ácido rosmarínico) tendrán mayor efectividad como antioxidantes en sistemas hidrofílicos, mientras que los extractos alcohólicos (con mayor contenido en ácido carnósico) lo harán mejor en sistemas lipofílicos.

## **11. Conclusiones.**

Los aceites esenciales tienen un efecto depresor de la fermentación ruminal y disminuyen la concentración de metano (CH<sub>4</sub>) .En particular el aceite esencial de Canela muestra el mayor efecto de disminución de fermentación ruminal; sin embargo es necesario seguir evaluando dosis y su interacción con tipos de dietas y combinaciones de diferentes extractos en los parámetros de fermentación y producción de metano ruminal *in vivo*.

## 12. Bibliografía general.

- Adamczyk, B. et al., 2017. Tannins and Their Complex Interaction with Different Organic Nitrogen Compounds and Enzymes: Old Paradigms versus Recent Advances. *ChemistryOpen*, 6(5), pp.610–614.
- Van Amburgh, M.E. et al., 2015. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. *Journal of Dairy Science*, 98(9), pp.6361–6380. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215004488#bib0365> [Accessed September 16, 2018].
- Anassori, E. et al., 2011. Garlic: A potential alternative for monensin as a rumen modifier. *Livestock Science*, 142(1–3), pp.276–287. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2011.08.003>.
- AOAC, 2016. AOAC Official Methods of Analysis. *Association of Official Agricultural Chemists*. Washington, D.C., 20th(Volume 1), pp.136–138.
- Bach Knudsen, K.E., 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science Technology*, 67(97), pp.319–338.
- Beauchemin, K.A. Kreuzer, M. O'Mara, F and McAllister, T.A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement : A review Nutritional management for enteric methane abatement : , (January 2016), pp.21–27.
- Blümmel, M. & Ørskov, E.R., 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 40(2–3), pp.109–119.
- Blümmel, M., Steingäß, H. & Becker, K., 1997. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77(06), pp.911–921. Available at: <http://dx.doi.org/10.1079/BJN19970089>.
- Bodas, R. et al., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), pp.78–93. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>.
- Bozin, B. et al., 2007. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), pp.7879–7885. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0715323> [Accessed April 30, 2018].
- Brillouet, J.-M. et al., 2014. Formation of vacuolar tannin deposits in the chlorophyllous organs of Tracheophyta: from shuttles to accretions. *Protoplasma*, 251(6), pp.1387–1393. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00709-014-0640-1> [Accessed September 20, 2018].
- Bruning-Fann, C.S. & Kaneene, J.B., 1993. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Veterinary and human toxicology*, 35(3), pp.237–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8351799> [Accessed September 18, 2018].
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Carro, M.D., et al., 2005. Effect of Garlic Oil and Four of its Compounds on Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 88(12), pp.4393–4404. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203020573126X>.
- Busquet, M. et al., 2006. Plant Extracts Affect In Vitro Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89(2), pp.761–771. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030206721373>.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C., 2005. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124 PA, pp.597–613.
- Cardozo, P.W. et al., 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. , (February), pp.2572–2579.
- Castillo-Gallegos, Epigmenio; Jarillo-Rodríguez, Jesús; Cortes Salazar, Ismael; Valles-de la Mora, Braulio; Ocaña-Zavaleta, E., 2012. NUMBER OF COWS AND BAGS NEEDED TO ESTIMATE in situ DRY MATTER DEGRADATION OF KINGGRASS (*Pennisetum purpureum*) LEAVES. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(2). Available at: <http://www.redalyc.org/html/939/93924626015/> [Accessed August 20, 2018].
- Castro-Montoya, J. et al., 2015. In vivo and in vitro effects of a blend of essential oils on rumen

- methane mitigation. *Livestock Science*, 180, pp.134–142. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.08.010>.
- Chalupa, W. et al., 1984. Rumen Fermentation In Vitro as Influenced by Long Chain Fatty Acids. *Journal of Dairy Science*, 67(7), pp.1439–1444. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030284814599> [Accessed August 10, 2018].
- Cieslak, A. et al., 2013. Plant components with specific activities against rumen methanogens. *Animal : an international journal of animal bioscience*, 7 Suppl 2(2013), pp.253–265.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., Marcotullio, M.C., et al., 2016. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 215, pp.25–36. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840116300591>.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M. & Yu, Z., 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of The Total Environment*, 545–546, pp.556–568. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>.
- Cochran, W.G. (William G. & Cox, G.M., 1992. *Experimental designs*, Wiley. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Experimental+Designs%2C+2nd+Edition-p-9780471545675> [Accessed April 8, 2018].
- Cone, J.W., van Gelder, A.H. & Bachmann, H., 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology*, 99(1–4), pp.221–231. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840102000731> [Accessed August 20, 2018].
- Czerkawski, J.W. & Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*, 38(1977), pp.371–384.
- Czerkawski, J.W. & Breckenridge, G., 1975. New inhibitors of methane production by rumen micro-organisms. Experiments with animals and other practical possibilities. *British Journal of Nutrition*, 34(03), pp.447–457. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0007114575000505](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114575000505) [Accessed August 20, 2018].
- Davies, Z.. et al., 2000. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 83(3–4), pp.205–221. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840199001388> [Accessed August 20, 2018].
- Dewi, A.D.R., Kusnadi, J. & Shih, W.-L., 2017. Comparison of the Main Bioactive Compounds and Antioxidant Activity from Garlic Water-soluble and Garlic Oil. *KnE Life Sciences*, 3(5), p.20. Available at: <https://knepublishing.com/index.php/Kne-Life/article/view/975>.
- Dillard, C.J. & Bruce German, J., 2000. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), pp.1744–1756.
- Duin, E.C. et al., 2016. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), pp.6172–6177. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27140643> [Accessed August 17, 2018].
- Durmic, Z. et al., 2010. In vitro fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 160(3–4), pp.98–109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.07.006>.
- Eckard, R.J., Grainger, C. & de Klein, C.A.M., 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, 130(1–3), pp.47–56. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141310000739> [Accessed September 14, 2018].
- Edwards, J.E. et al., 2008. Advances in microbial ecosystem concepts and their consequences for ruminant agriculture. *Animal*, 2(05), pp.653–660.
- FAO, 2011. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2010-11*, Available at: <http://www.fao.org/docrep/017/i3028s/i3028s.pdf%5Cnhttp://www.fao.org/publications/sofa/es/>

- FAO, 2016. *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2016: Cambio climático, agricultura y seguridad alimentaria*.
- FAO, FIDA & PMA, 2013. *El estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2013. Las múltiples dimensiones de la seguridad alimentaria*, Available at: <http://www.fao.org/docrep/019/i3434s/i3434s.pdf>.
- Ferme, D. et al., 2004. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia microbiologica*, 49(2), pp.151–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15227787> [Accessed April 8, 2018].
- Fernández-Agulló, A., Freire, M.S. & González-Álvarez, J., 2015. Effect of the extraction technique on the recovery of bioactive compounds from eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) wood industrial wastes. *Industrial Crops and Products*, 64, pp.105–113. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.031>.
- Firkins, J.L. et al., 1998. Modeling Ruminant Digestibility of Carbohydrates and Microbial Protein Flow to the Duodenum. *Journal of Dairy Science*, 81(12), pp.3350–3369. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030298759016> [Accessed August 13, 2018].
- Flachowsky, G. & Lebzien, P., 2012. Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), pp.70–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.009>.
- France, J. & Dijkstra, J., 2005. Volatile fatty acid production. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Wallingford: CABI, pp. 157–175. Available at: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20053225690>.
- Galyean, M. & May, T., 1989. Laboratory procedure in animal nutrition research. *Department of Animal and Life Science. New ...* Available at: [ftp://196.44.109.146/data/Buckup05062013/Gaston/Alfred documents/graggio/Alfred/Research/Literature\\_papers/metodology/Laboratory procedures in animal nutrition research. Galyean 1997.pdf](ftp://196.44.109.146/data/Buckup05062013/Gaston/Alfred%20documents/graggio/Alfred/Research/Literature_papers/metodology/Laboratory%20procedures%20in%20animal%20nutrition%20research.%20Galyean%201997.pdf).
- Garnsworthy, P.C. et al., 2012a. On-farm methane measurements during milking correlate with total methane production by individual dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(6), pp.3166–3180. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212002913?via%3Dihub> [Accessed May 31, 2018].
- Garnsworthy, P.C. et al., 2012b. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *Journal of Dairy Science*, 95(6), pp.3181–3189. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030212002925>.
- Getachew, G. et al., 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 72(3–4), pp.261–281.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K., 2002. Tropical browses: contents of phenolic compound and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *J Agr Sci Camb*, 139(2002), pp.341–352.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J., 1970. *Forage Fiber Analysis (Apparatus Reagents, Procedures and Some Applications)*, Washington DC.: United States Department of Agriculture. Available at: <https://trove.nla.gov.au/work/21626310?q&versionId=46035777>.
- Goopy, J.P. et al., 2011. Validation of a short-term methane measurement using portable static chambers to estimate daily methane production in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp.219–226. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111001313?via%3Dihub> [Accessed May 31, 2018].
- Gopu, C.L. et al., 2008. Simultaneous determination of cinnamaldehyde, eugenol and piperine by HPTLC densitometric method. *Phytochemical Analysis*, 19(2), pp.116–121.
- Grainger, C. & Beauchemin, K.A., 2011. Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp.308–320. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.021>.
- Groot, J.C.J. et al., 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of



- ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 64(1), pp.77–89.
- Guffanti, A.A. et al., 1979. Nigericin-induced Death of an Acidophilic Bacterium. *Journal of General Microbiology*, 114(1), pp.201–206. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/42667%0Ahttp://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-114-1-201> [Accessed May 25, 2018].
- Hart, K.J. et al., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1–3), pp.8–35. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840107003550>.
- Hopson, J.D., Johnson, R.R. & Dehority, B.A., 1963. Evaluation of the Dacron Bag Technique as a Method for Measuring Cellulose Digestibility and Rate of Forage Digestion. *Journal of Animal Science*, 22(2), pp.448–453. Available at: <https://academic.oup.com/jas/article/22/2/448-453/4699092> [Accessed August 21, 2018].
- Hostettmann, K. & Marston, A., 1995. Saponins (Chemistry and pharmacology of natural products). 1995. Available at: [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Saponins.Chemistry.and.Pharmacology.of.Natural.Products&author=K.Hostettmann&publication\\_year=1995](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Saponins.Chemistry.and.Pharmacology.of.Natural.Products&author=K.Hostettmann&publication_year=1995) [Accessed September 21, 2018].
- Hristov, A.N. et al., 2015. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), pp.10663–10668. Available at: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1504124112>.
- Humer, E. et al., 2017. Invited review: Practical feeding management recommendations to mitigate the risk of subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, pp.1–17. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217310664>.
- Ibañez, E. et al., 2003. Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), pp.375–382. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf025878j> [Accessed April 30, 2018].
- INECC, 2016. Inventario Nacional de Emisiones y Compuestos de Gases de Efecto Invernadero. In *Coordinación General de Cambio Climático y Desarrollo Bajo en Carbono*. México, D.F.: INECC.
- IPCC, 2014a. *Cambio climático 2014. Informe de síntesis Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático* Quinto Inf. R. K. Pachauri et al., eds., Ginebra, Suiza: OMM.
- IPCC, 2007. Climate change 2007: the physical science basis. *Intergovernmental Panel on Climate Change*, 446(7137), pp.727–8. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544840%5Cnhttp://www.slvwd.com/agendas/Full/2007/06-07-07/Item 10b.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19544840%5Cnhttp://www.slvwd.com/agendas/Full/2007/06-07-07/Item%2010b.pdf).
- IPCC, 2014b. *Climate Change 2014 Mitigation of Climate Change*, Available at: <http://ebooks.cambridge.org/ref/id/CBO9781107415416>.
- Jahani-Azizabadi, H. et al., 2011. Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using in vitro batch culture. *African Journal of Microbiology Research*, 5(27), pp.4812–4819.
- Jarvis, G.N. & Moore, E.R.B., 2010. Lipid Metabolism and the Rumen Microbial Ecosystem. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 2245–2257. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4\\_163](http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-77587-4_163).
- Jayanegara, A. et al., 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 209, pp.60–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.002>.
- Jenkins, T.C., 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science*, 76(12), pp.3851–3863. Available at: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77727-9](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9).
- Jiang, Y. et al., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32(1), pp.63–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>.
- Johnson, K.A. & Johnson, D.E., 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*,

- 73(8), pp.2483–2492. Available at: <https://academic.oup.com/jas/article/73/8/2483-2492/4632901> [Accessed May 24, 2018].
- Jouany, J.P. & Morgavi, D.P., 2007. Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*, 1(10), pp.1443–1466.
- Kalra, E.K., 2003. Nutraceutical--definition and introduction. *AAPS pharmSci*, 5(3), p.E25.
- Van Keuren, R.W. & Heinemann, W.W., 1962. Study of a Nylon Bag Technique for In Vivo Estimation of Forage Digestibility. *Journal of Animal Science*, 21(2), pp.340–345. Available at: <https://academic.oup.com/jas/article/21/2/340-345/4698785> [Accessed August 21, 2018].
- Knapp, J.R. et al., 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of dairy science*, 97(6), pp.3231–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746124>.
- Knezevic, P. et al., 2016. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensis essential oils and their interactions with conventional antimicrobial agents against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 178, pp.125–136. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874115302609> [Accessed October 30, 2018].
- Kobayashi, Y., 2010. Abatement of Methane Production from Ruminants: Trends in the Manipulation of Rumen Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(3), pp.410–416. Available at: <http://ajas.info/journal/view.php?doi=10.5713/ajas.2010.r.01>.
- Kraus, T.E.C., Dahlgren, R.A. & Zasoski, R.J., 2003. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems - a review. *Plant and Soil*, 256, pp.41–66. Available at: <https://www.jstor.org/stable/24123358> [Accessed September 18, 2018].
- Kumar, S. et al., 2013. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions. *Research in Veterinary Science*, 94(2), pp.263–268. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.007>.
- Kumar, S. et al., 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), pp.1557–1566. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-009-0041-3> [Accessed September 14, 2018].
- Kumar, S. et al., 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), pp.31–44.
- Lafllin, S.L. & Gnad, D.P., 2008. Rumen Cannulation: Procedure and Use of a Cannulated Bovine. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 24(2), pp.335–340.
- Lean, I.J., Golder, H.M. & Hall, M.B., 2014. Feeding, Evaluating, and Controlling Rumen Function. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 30(3), pp.539–575.
- Lee, C. & Beauchemin, K.A., 2014. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(4), pp.557–570. Available at: <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjas-2014-069>.
- Li, L. et al., 2011. An initial investigation on rumen fermentation pattern and methane emission of sheep offered diets containing urea or nitrate as the nitrogen source. *Animal Production Science*, 52(7), pp.653–658. Available at: <http://www.publish.csiro.au/?paper=AN11254> [Accessed September 18, 2018].
- Liebe, D.M. et al., 2018. Technical note: Methodological and feed factors affecting measurement of protein A, B, and C fractions, degradation rate, and intestinal digestibility of rumen-undegraded protein. *Journal of Dairy Science*, pp.1–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2018-14837>.
- Lombardi, L. et al., 2011. Carbon dioxide removal and capture for landfill gas up-grading. *Energy Procedia*, 4, pp.465–472. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2011.01.076>.
- Lorenz, M.M. et al., 2014. Relationship between condensed tannin structures and their ability to precipitate feed proteins in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(5), pp.963–968. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.6344> [Accessed September 18, 2018].
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E. & Wallace, R.J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *animal*, 4(07), pp.1008–1023. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S175173111000042X](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S175173111000042X) [Accessed August 14, 2018].
- Lovett, D.K. et al., 2006. Effect of feeding *Yucca schidigera* extract on performance of lactating

- dairy cows and ruminal fermentation parameters in steers. *Livestock Science*, 102(1–2), pp.23–32. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871141305004245?via%3Dihub> [Accessed September 21, 2018].
- Lyu, Z. et al., 2018. Methanogenesis. *Current Biology*, 28(13), pp.R727–R732.
- McAllister, T.A. et al., 2011. Greenhouse gases in animal agriculture—Finding a balance between food production and emissions. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp.1–6. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111001763> [Accessed December 21, 2015].
- McGrath, J. et al., 2018. Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. *Research in Veterinary Science*, 116(September 2017), pp.28–39.
- Mehrez, A.Z. & Ørskov, E.R., 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 88(3), pp.645–650.
- Mendel, M. et al., 2017. Phytogetic feed additives as potential gut contractility modifiers—A review. *Animal Feed Science and Technology*, 230, pp.30–46. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.008>.
- Menke, K. H., Raab, L. & Steingass, H., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *The journal of agricultural science*, 93(1), pp.217–222.
- Mertens, D.R., 1997. Creating a System for Meeting the Fiber Requirements of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 80(7), pp.1463–1481. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241608> [Accessed September 21, 2018].
- Mokhtarpour, A. et al., 2016. Effect of treating alfalfa silage with pistachio by-products extract on Saanen dairy goats performance and microbial nitrogen synthesis. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(4), pp.758–767. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpn.12384> [Accessed September 18, 2018].
- Molina Botero, C.I. et al., 2013. Producción de metano in vitro de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Revista CES Med Vet y Zoot*, 8(2), pp.15–31.
- Morgavi, D.P. et al., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4(7), pp.1024–1036.
- Muetzel, S., Hunt, C. & Tavendale, M.H., 2014. A fully automated incubation system for the measurement of gas production and gas composition. *Animal Feed Science and Technology*, 196, pp.1–11. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840114001916> [Accessed August 20, 2018].
- Nanon, A., Suksombat, W. & Yang, W.Z., 2014. Effects of essential oils supplementation on in vitro and in situ feed digestion in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 196, pp.50–59. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.006>.
- National Research Council (U.S.). Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition., 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle*, National Academy Press.
- Nocek, J.E., 1988. In situ and Other Methods to Estimate Ruminant Protein and Energy Digestibility: A Review. *Journal of Dairy Science*, 71(8), pp.2051–2069. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030288797817>.
- Nocek, J.E. & Tamminga, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), pp.3598–3629. Available at: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78552-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78552-4).
- Nolan, J. V. et al., 2010. Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. *Animal Production Science*, 50(8), p.801. Available at: <http://www.publish.csiro.au/?paper=AN09211> [Accessed September 18, 2018].
- O'Mara, F.P., 2011. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp.7–15. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111001933> [Accessed September 14, 2018].
- Ogle, S.M. et al., 2014. Reducing greenhouse gas emissions and adapting agricultural management for climate change in developing countries: providing the basis for action. *Global*

- Change Biology*, 20(1), pp.1–6. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/gcb.12361> [Accessed September 14, 2018].
- Olijhoek, D.W. et al., 2016. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), pp.6191–6205. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030216303010> [Accessed September 18, 2018].
- Ørskov, E.R., Flatt, W.P. & Moe, P.W., 1968. Fermentation Balance Approach to Estimate Extent of Fermentation and Efficiency of Volatile Fatty Acid Formation in Ruminants. *Journal of Dairy Science*, 51(9), pp.1429–1435. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203026887208X>.
- Ørskov, E.R. & McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), pp.499–503.
- Ørskov, E.R. & McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(02), p.499. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S0021859600063048](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0021859600063048) [Accessed April 9, 2018].
- Osborn, A., 1996. Saponins and plant defence — a soap story. *Trends in Plant Science*, 1(1), pp.4–9. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138596800161?via%3Dihub> [Accessed September 21, 2018].
- Pandey, M., Verma, R.K. & Saraf, S.A., 2010. Nutraceuticals: New era of medicine and health. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 3(1), pp.11–15.
- Patra, A. et al., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1).
- Patra, A.K., 2012. *Dietary Phytochemicals and Microbes* 1st ed. A. K. Patra, ed., Kolkata, India: Springer Netherlands. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-3926-0>.
- 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3), pp.511–520.
- Patra, A.K. & Saxena, J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11–12), pp.1198–1222. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>.
- Patra, A.K. & Saxena, J., 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 96(4), pp.363–375.
- Patra, A.K. & Yu, Z., 2013a. Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. *Bioresource Technology*, 148, pp.352–360. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.140>.
- Patra, A.K. & Yu, Z., 2012. Effects of Essential Oils on Methane Production and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), pp.4271–4280. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22492451> [Accessed April 12, 2018].
- Patra, A.K. & Yu, Z., 2015. Effects of garlic oil, nitrate, saponin and their combinations supplemented to different substrates on in vitro fermentation, ruminal methanogenesis, and abundance and diversity of microbial populations.
- Patra, A.K. & Yu, Z., 2013b. Effects of gas composition in headspace and bicarbonate concentrations in media on gas and methane production, degradability, and rumen fermentation using in vitro gas production techniques. *Journal of dairy science*, 96(7), pp.4592–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684023>.
- Pell, A.N. & Schofield, P., 1993. Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion In Vitro. *Journal of Dairy Science*, 76(4), pp.1063–1073. Available at: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77435-4](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77435-4).

- Pérez-Barbería, F.J., 2017. Scaling methane emissions in ruminants and global estimates in wild populations. *Science of the Total Environment*, 579, pp.1572–1580. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.175>.
- Pers-Kamczyc, E. et al., 2011. Development of nucleic acid based techniques and possibilities of their application to rumen microbial ecology research. *J. Anim. Feed Sci.*, 20, pp.315–337. Available at: <http://www.jafs.com.pl/Development-of-nucleic-acid-based-techniques-and-possibilities-of-their-application-to-rumen-microbial-ecology-research,66189,0,2.html>.
- Pinares-Patiño, C.S. et al., 2013. Heritability estimates of methane emissions from sheep. *Animal*, 7(s2), pp.316–321. Available at: [http://www.journals.cambridge.org/abstract\\_S1751731113000864](http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731113000864).
- Pinares-Patiño, C.S. et al., 2011. Repeatability of methane emissions from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, pp.210–218. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377840111001878> [Accessed May 31, 2018].
- Pitt, R.E. et al., 1999. Use of in vitro gas production models in ruminal kinetics. *Mathematical Biosciences*, 159(2), pp.145–163. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025556499000206>.
- Pitta, D.W. et al., 2018. Symposium review: Understanding diet–microbe interactions to enhance productivity of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, pp.1–19. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030218305289>.
- Prakash, D., 2014. Methyl-coenzyme M reductase: Elucidating the process of activation and study of the effect of the methanogenesis inhibitor 3-nitrooxypropanol. Available at: <https://etd.auburn.edu/handle/10415/4463> [Accessed May 29, 2018].
- Pressman, B.C., 1976. Biological Applications of Ionophores. *Annual Review of Biochemistry*, 45(1), pp.501–530. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/786156> [Accessed May 24, 2018].
- Quin, J.I. & Myburgh, S.J., 1943. Studies on the alimentary tract of merino sheep in South Africa. VII. Fermentation in the forestomachs of sheep. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 18(1 & 2), pp.91–112.
- Rabiee, A.R. et al., 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science*, 95(6), pp.3225–3247. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030212002974> [Accessed August 14, 2018].
- Robinson, D.L. et al., 2010. Repeatability, animal and sire variation in 1-hr methane emissions and relationships with rumen volatile fatty acid concentrations. *Proceedings of the world congress on genetics applied to livestock production*, (September 2016), p.4.
- Rodríguez-Rojo, S. et al., 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), pp.98–103.
- Romero-Pérez, A. et al., 2015. Effects of 3-nitrooxypropanol on methane production using the rumen simulation technique (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 209(38715042), pp.98–109. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.002>.
- Romero-Pérez, A. & Beauchemin, K.A., 2018. El uso de inhibidores enzimáticos de la metanogénesis en rumiantes. *AgroProductividad*, 11(1), pp.16–21. Available at: <https://www.colpos.mx/wb/index.php/agroproductividad#Ww3n1-4vzIU>.
- De Rosa, M., Gambacorta, A. & Gliozzi, A., 1986. Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiological reviews*, 50(1), pp.70–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3083222> [Accessed May 5, 2018].
- Ross, E.M. et al., 2013. Investigating the effect of two methane-mitigating diets on the rumen microbiome using massively parallel sequencing. *Journal of Dairy Science*, 96(9), pp.6030–6046. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021300516X>.
- Russell, J.B. et al., 1992. A Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Cattle Diets: I. Ruminal Fermentation. *Journal of animal science*, 71(5), pp.1298–1311.
- Russell, J.B. & Strobel, H.J., 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 55(1), pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2650616> [Accessed May 24, 2018].
- Rymer, C. et al., 2005. In vitro cumulative gas production techniques : History , methodological considerations and challenges. , 124, pp.9–30.

- Salem, A.Z.M., 2012. Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifies in vitro gas production of other tree leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), pp.94–101. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.011>.
- Saminathan, M. et al., 2016. Effects of condensed tannin fractions of different molecular weights on population and diversity of bovine rumen methanogenic archaea in vitro, as determined by high-throughput sequencing. *Animal Feed Science and Technology*, 216, pp.146–160. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840116301407> [Accessed September 18, 2018].
- Santoso, B., Kilmaskossu, A. & Sambodo, P., 2007. Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 137(1–2), pp.58–68. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840106003981?via%3Dihub> [Accessed September 21, 2018].
- Santoyo, S. et al., 2005. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4), pp.790–795. Available at: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-68.4.790> [Accessed April 30, 2018].
- Seifried, N., Steingäß, H. & Rodehutschord, M., 2015. In vitro and in situ evaluation of secondary starch particle losses from nylon bags during the incubation of different cereal grains. *Animal Feed Science and Technology*, 210, pp.26–36. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.011>.
- Sejian, V. et al., 2011. Assessment Methods and Indicators of Animal Welfare. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6(4), pp.301–315. Available at: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajava.2011.301.315> [Accessed September 14, 2018].
- Shan, B. et al., 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J. Agric. Food Chem.*, (53), pp.7749–7759.
- Shaw, N.M., Bolwell, G.P. & Smith, C., 1990. Wound-induced phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs. Significance of glycosylation and immunolocalization of enzyme subunits. *Biochemical Journal*, 267(1), pp.163–170. Available at: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/bj2670163> [Accessed September 20, 2018].
- Shima, S. & Thauer, R.K., 2005. Methyl-coenzyme M reductase and the anaerobic oxidation of methane in methanotrophic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8(6), pp.643–648. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952740500158X?via%3Dihub> [Accessed May 29, 2018].
- Shingfield, K.J. & Wallace, R.J., 2014. CHAPTER 1. Synthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. In pp. 1–65. Available at: <http://ebook.rsc.org/?DOI=10.1039/9781782620211-00001> [Accessed August 14, 2018].
- Sindelar, J.J. & Milkowski, A.L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide*, 26(4), pp.259–266. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22487433> [Accessed September 18, 2018].
- Sniffen, C.J. et al., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of animal science*, 70(11), pp.3562–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1459919> [Accessed August 13, 2018].
- Van Soest, P.J., 1982. *Nutritional ecology of the ruminant: ruminant metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and the chemistry of forages and plant fibres*, O & B Books. Available at: [https://books.google.com.mx/books/about/Nutritional\\_Ecology\\_of\\_the\\_Ruminant.html?id=qjNHnQEACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Nutritional_Ecology_of_the_Ruminant.html?id=qjNHnQEACAAJ&redir_esc=y) [Accessed May 5, 2018].
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A., 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), pp.3583–3597. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030291785512> [Accessed April 14, 2016].
- Sparg, S.G., Light, M.E. & van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3), pp.219–243. Available at:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104002557?via%3Dihub> [Accessed September 21, 2018].
- Tagliapietra, F. et al., 2010. In vitro rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. *Animal Feed Science and Technology*, 158(3–4), pp.197–201. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840110001264> [Accessed August 20, 2018].
- Tekippe, J.A. et al., 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(12), pp.7892–7903. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030213006966>.
- Theodorou, M.K. et al., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4), pp.185–197.
- Tilley, J.M.A. & Terry, R.A., 1963. a Two-Stage Technique for the in Vitro Digestion of Forage Crops. *Grass and Forage Science*, 18(2), pp.104–111.
- Tocmo, R. et al., 2016. Boiling enriches the linear polysulfides and the hydrogen sulfide-releasing activity of garlic. *Food Chemistry*, 221, pp.1867–1873. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.076>.
- Ungerfeld, E.M. et al., 2007. A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *Journal of Animal Science*, 85(10), pp.2556–2563.
- Varshavsky, A., 2001. Proteolysis. In *Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 1573–1575. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122270800010417>.
- Vázquez Flores, A.A. et al., 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua*, VI(2), pp.84–93.
- Weimer, P.J., 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*, 6(APR), pp.1–16.
- Wencelová, M. et al., 2015. Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. *Small Ruminant Research*, 125, pp.64–72.
- Wilkins, J.R., 1974. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. *Applied microbiology*, 27(1), pp.135–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4589123> [Accessed August 20, 2018].
- William, P. & Salazar, C., 2005. *UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA Departament de Ciència Animal i dels Aliments Efectos de los Extractos de Plantas sobre las Características de Fermentación Microbiana Ruminal en Sistemas In Vitro e In Vivo*.
- Williams, Y.J. et al., 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), pp.1860–1866.
- van Wyngaard, J.D.V., Meeske, R. & Erasmus, L.J., 2018. Effect of dietary nitrate on enteric methane emissions, production performance and rumen fermentation of dairy cows grazing kikuyu-dominant pasture during summer. *Animal Feed Science and Technology*, 244, pp.76–87. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840118307624> [Accessed September 18, 2018].
- Yáñez-Ruiz, D.R. et al., 2016. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants-a review. *Animal Feed Science and Technology*, 216, pp.1–18.
- Yang, K. et al., 2017. Effects of dietary supplementing tannic acid in the ration of beef cattle on rumen fermentation, methane emission, microbial flora and nutrient digestibility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(2), pp.302–310. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpn.12531> [Accessed September 18, 2018].
- Zebeli, Q. et al., 2012. Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(3), pp.1041–1056. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365188> [Accessed September 21, 2018].
- Zhang, Z.W. et al., 2018. Nitrocompounds as potential methanogenic inhibitors in ruminant animals: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 236, pp.107–114. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.010>.

- Zhu, Z., Mao, S. & Zhu, W., 2012. Effects of ruminal infusion of garlic oil on fermentation dynamics, fatty acid profile and abundance of bacteria involved in biohydrogenation in rumen of goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25(7), pp.962–970.
- van Zijderveld, S.M. et al., 2011. Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of dairy science*, 94(8), pp.4028–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21787938> [Accessed September 18, 2018].