



*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Facultad de Ciencias Agropecuarias*  
*Escuela para Graduados*



**USO DE ACEITES ESENCIALES  
PARA MODULAR LA ACTIVIDAD MICROBIANA  
EN EL RUMEN CON EL FIN DE REDUCIR  
LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO**

**Florencia Garcia**

Tesis

Para optar al Grado Académico de  
Doctor en Ciencias Agropecuarias

*Córdoba, 2018*

# **USO DE ACEITES ESENCIALES PARA MODULAR LA ACTIVIDAD MICROBIANA EN EL RUMEN CON EL FIN DE REDUCIR LA PRODUCCIÓN DE METANO ENTÉRICO**

**Florencia Garcia**

## **Comisión Asesora de Tesis**

**Director:** Ing. Agr. (PhD.) Darío Colombatto

**Asesores:** Ing. Agr. (Dr.) Enrique I. Lucini (Codirector)  
Lic. Mic. (Dra.) Ma. Valeria Moreno

## **Tribunal Examinador de Tesis**

DMV (PhD.) Cecilia Cajarville Sanz

Lic. Mic. (Dra.) Ma. Valeria Moreno

Ing. Agr. (PhD.) Gustavo Jaurena

## **Presentación formal académica**

7 de mayo de 2018

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis sintetiza varios años de trabajo, llenos de historias, vivencias, anécdotas, risas y lágrimas, con muchas personas a las que tengo tantísimo por agradecer. Es el fruto de un largo proceso al que le dediqué un tiempo de mi vida, pero que solo fue posible por el apoyo, la ayuda y el afecto de aquellos que de alguna u otra forma me acompañaron en este camino.

Quiero empezar agradeciendo a mi compañero, Jorge, que fue el punta pie inicial de este trabajo, quien me contagió la pasión por la investigación y que me inspiró con su motivación. Gracias por todo el apoyo y la contención durante este proceso, especialmente en la etapa final durante el arduo momento de la escritura. Gracias por la agudeza de tus observaciones, por haberme sostenido y alentado en cada paso, con tanto amor y comprensión.

Matutín, mi solcito, gracias por tu paciencia en mis días de locura. Gracias por recordarme que en la vida hay cosas mucho más importantes. Gracias por tu llegada, tu amor y tus sonrisas. Gracias por sacarme de la burbuja *tesis* y conectarme con la del *juego y la risa*.

Doy gracias infinitas a mis padres, Catalina y Miguel, quienes sembraron en mí la curiosidad, el afán de conocer nuevas cosas, de explorar, y que gracias a su amor y apoyo incondicional esto ha sido posible. Siempre presentes, en todo momento, para socorrerme ante los más diversos pedidos de ayuda. Porque “*Madre hay una sola*”, diría ella, que es *madre* una, pero con funciones varias...*abuela, apoyo, motor* y hasta *guía* en mi incursión en la microbiología... A mi hermana, Maruca, a Santi y Simón, por recordarme lo lindo que es disfrutar de las más simples cosas. A Ceci, por su amor y ayuda durante la última etapa.

A Chachi y Amanda, que junto a Jorge me acompañan en este largo camino desde la primera planta que juntamos, allá en Characato. Con las que compartí esos viajes que eran *tareas de campo-paseos de trabajo-encuentro* y que estuvieron a mi lado en tantos otros recovecos de este camino. A Vale, por la guía y la amistad, por las descontracturantes idas a Cosquín y los mates y charlas compartidas, por tu constante abrazo y cariño. A Caro, compañera de aventuras, de viajes, amiga y confidente. A Patita, incondicional compañero, con la picardía justa para hacer del trabajo un lugar más divertido. Porque con ellos las esferas se mezclan en una dulce combinación de compañeros de trabajo y amigos que te regala la vida.

A mis compañeros de INTA: Georgi, Laura, Carla y Ricky por el tiempo compartido, desde el mate de la mañana, con charla y desperezos, hasta todo su apoyo y ayuda durante los ensayos.

A Coty Carreras, que me guió y estimuló para que emprendiera este camino, brindando todo su apoyo y acompañamiento en el proceso de solicitud de beca.

A los compañeros de los otros laboratorios de INTA: Merce, Roxi, Eva, Gabi y Seba, por su generosidad para colaborar en la solución de todo tipo de problemas y por la buena onda.

A mis compañeros de Cátedra: Pancho, Ale, Mario, Emi, Belu y Carlitos, por la paciencia en mis largas ausencias y por los asados de los martes, que ayudaron a distender la semana.

A Vale, Ana Barnes y María Esperanza Cerón, quienes a pesar de mi corta incursión en el mundo de la microbiología clásica me brindaron su tiempo para guiarme en esta área tan desconocida por mí.

Gracias por la generosa colaboración y aportes de Juan y Evi Argüello, Ricardo Asieto, Javi Bernasconi, Moni Bocco, Eduardo Budini, Boris Camiletti, Juan Manuel Cantet, Julio DiRienzo, Marcos Karlin y Paula Martín.

Gracias a los estudiantes que colaboraron inmensamente en la realización de los ensayos y que sin su colaboración no hubiera podido alcanzar los objetivos en los tiempos que se lograron: Maximiliano Aguirre, Emilia Clemente, Matías DeMaría, Valentín Morales, Ana Laura Llanes y Violeta Evangelina Ruiz Diaz.

Durante el desarrollo de la tesis tuve la fortuna de poder hacer parte de la tesis en Australia. Esta experiencia dejó muchos afectos a quienes quiero agradecer con mi más cariñoso saludo. A mi familia Australiana: Anita, Pati, Bhato, Dot, Lyn y Rob. A mi querida amiga del alma, Tulia, por largas charlas y momentos compartidos. A mis supervisores: Phil Vercoe y Zoey Durmic, por la paciencia y sus valiosos aportes que contribuyeron de una manera muy significativa en mi formación. A mis entrañables amigos, Xixi Li, Pete Hutton, Gonzalo Mata, y compañeros de trabajo: Bidhyut Banik, Garry Cass, Dominique Blache, Joy Vadhanobhuti y Sashka. A las estudiantes Francesas, Eve, Melanie y Charlotte, por su frescura, alegría y que me ayudaron inmensamente para poder cumplir los objetivos.

Quiero agradecer muy especialmente a mis directores, por su confianza y dedicación desde el inicio de este trabajo: A Darío, que con simples palabras y oportunas sugerencias me ayudó a trazar la senda para que las ideas lleguen a puerto. A Enrique por su apoyo y paciencia al introducirme en el mundo de la química. A Vale, por su dedicación y aportes con una mirada distinta. A María José por toda su ayuda y afecto.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me otorgó una beca para poder realizar este doctorado. A la Estación Experimental Agropecuaria de Manfredi del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), a sus autoridades y a todo el equipo del Área de Producción Animal, especialmente a Ariel Odorizzi, por el apoyo institucional para poder realizar allí mi trabajo de tesis. Al Programa Nacional de Producción Animal de INTA que brindó el financiamiento para poder ejecutar la parte experimental.

También agradecer a Cecilia Cajarville, Valeria Moreno y Gustavo Jaurena quienes conformaron el tribunal que evaluó la tesis, por la calidad de sus aportes, reflexiones y recomendaciones que resultaron en significativas mejoras de esta tesis.

Es mi deseo agradecer a todas y cada una de las personas o instituciones que de una u otra forma colaboraron en el desarrollo de este trabajo que me hizo crecer profesional y personalmente. Cinco años es mucho tiempo y temo que a su paso, alguien pueda haber quedar en el tintero. Van entonces unas merecidas *gracias* a todo aquel que formó parte de este hermoso proceso, a todos los que me acompañaron disfrutando de las distintas etapas, a los que me alentaron en los momentos de angustia, a los que creyeron profundamente en mí y se merecen todos los frutos que este trabajo, humildemente, pueda dar.

*A Mati*

*Porque con tu llegada todo cambió de color y tomó otra dimensión.*

*A Jorge*

*Por enchufar mis pies en la tierra.*

*A mis padres*

*Por su infinito amor, incondicional apoyo y abrazo.*

*A Mari, Santi y Simón*

*Por contagiarme con tanta alegría.*

## RESUMEN

La producción de metano por parte de los rumiantes es una de las mayores fuentes de gases de efecto invernadero en el sector agrícola-ganadero, así como una pérdida de energía para el animal. Existen distintas estrategias para mitigar su producción, entre ellas se encuentran los modificadores de la fermentación ruminal. El objetivo de la presente tesis fue evaluar el uso de aceites esenciales (AE) de plantas nativas de Argentina como fuentes de aditivos naturales para la alimentación de rumiantes con el fin de disminuir la producción de metano entérico. En la etapa inicial se evaluaron los AE de plantas de Argentina: *Aloysia gratissima*, *Lippia turbinata* (LT), *Schinus molle* y *Tagetes minuta* (TM), junto con otros ya evaluados en el microbioma ruminal: *Eucalyptus globulus*, *Mentha x piperita* var. *vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*. Se determinó la composición química de los AE para relacionarla con los efectos observados. Se realizaron dos ensayos de producción de gas *in vitro* a distintas dosis para identificar las combinaciones de AE y dosis que inhiban la metanogénesis sin afectar la digestibilidad del sustrato. La respuesta dependió del AE (especie vegetal) y de la dosis, lo que se atribuyó a las diferencias en su composición química. Con las mayores dosis disminuyó la producción de metano, pero la digestibilidad también se redujo. Con los AE de LT y TM la producción de metano disminuyó un 40% sin afectar la digestibilidad, por lo que se eligieron para siguientes estudios. En el AE de LT el limoneno fue el componente en mayor proporción y los hidrocarburos fueron el principal grupo funcional. En TM el principal compuesto fue la verbenona, y las cetonas fueron el grupo químico más abundante. Los terpenos oxigenados representaron menos del 30% en LT y más del 90% en TM. En la segunda etapa se evaluaron dosis crecientes de LT y TM en ensayos de producción de gas *in vitro* con cinco sustratos. Como se esperaba, el efecto dependió del sustrato y de la dosis pero el comportamiento difirió entre ambos AE. Esto se atribuyó a las diferencias en las condiciones del medio en el que los componentes de los AE pueden interactuar de distinta manera, especialmente según el pH. Se concluyó que debe existir una interacción entre las condiciones del medio de fermentación y la naturaleza química de los componentes del AE, lo que modificaría sus propiedades físicoquímicas. Dada la posibilidad de que la efectividad de los AE disminuya con el tiempo, el último estudio evaluó la persistencia de los efectos de los AE de LT y TM en la producción de metano *in vitro* en un sistema de cultivo semi-continuo, así como la rotación entre ambos AE (LT/TM) como estrategia para prolongar su capacidad antimetanogénica. La inhibición de la producción de metano se produjo inmediatamente luego de agregar los AE de LT y TM, y se mantuvo durante el período experimental. El tratamiento de LT/TM no mostró mejores resultados que la adición individual de cada AE. En esta tesis se presenta información inédita respecto al uso de AE de especies nativas de Argentina como modificadores de la fermentación ruminal. Los AE de LT y TM son efectivos para reducir la producción de metano *in vitro*, con efectos mínimos o nulos sobre la digestibilidad del sustrato a dosis adecuadas (en función del sustrato y del tipo de sistema de fermentación). Las diferencias en los efectos de ambos AE sugieren que sus mecanismos de acción difieren, y que actúan sobre distintas poblaciones microbianas. Los aceites esenciales de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* pueden ser considerados como candidatos para el desarrollo de nuevos aditivos en la nutrición de rumiantes como estrategia para mitigar la producción de metano entérico.

**Palabras clave:** cambio climático, rumiantes, compuestos bioactivos, fermentación ruminal.

## ABSTRACT

Methane production from ruminants implies a loss of energy for the animal and also it is one of the largest sources of greenhouse gas from the agricultural sector. There are different strategies to mitigate its production, one of which is the use of ruminal fermentation modifiers. The objective of the present Thesis was to evaluate the use of essential oils (EO) of native plants from Argentina as source of natural in-feed additives for ruminants aiming to reduce enteric methane production. In the first step, EO of plants from Argentina: *Aloysia gratissima*, *Lippia turbinata* (LT), *Schinus molle* y *Tagetes minuta* (TM), were evaluated along other previously studied in the ruminal microbiome: *Eucalyptus globulus*, *Mentha x piperita* var. *vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris*. The chemical composition of EO was determined so as to link them with the observed effects. Two *in vitro* gas production assays were performed with different doses to identify the best combinations between EO and dose that inhibited methanogenesis without affecting the digestibility of the substrate. The effect depended on the EO (vegetal species) and the dose, which was attributed to the differences in their chemical composition. The highest doses of EO decreased methane production, but also reduced the digestibility. With EO of LT and TM methane production was decreased over 40% without affecting digestibility, and were chosen for further studies. The main component in the EO of LT was limonene, and hydrocarbons were the principal functional group. In TM the main compound was verbenone, and ketones were the most abundant chemical group. Terpenes with oxygen accounted for less than 30% in LT and more than 90% in TM. In the second stage, increasing doses of LT and TM were evaluated with the *in vitro* gas production technique with five substrates. As expected, the effect depended on the substrate and dose, but the trend differed between the two EO. This was attributed to the differences in the incubation media conditions where EO compounds can interact in different ways, especially regarding pH. It was concluded that it may exist an interaction between the conditions of the fermentation media and the chemical nature of the EO compounds, which would modify their physicochemical properties. Due to the possibility that the effectiveness of EO may decrease over time, the last study evaluated the persistence of the effects of LT and TM on *in vitro* methane production in a semi-continuous culture system, as well as the rotation between both AE (LT / TM) as a strategy to prolong its antimethanogenic effect. Methane production was significantly inhibited shortly after addition of both EO when incorporated individually, and persisted over the experimental period. TM/LT treatment did not bring further improvements in reduction or persistency compared to the inclusion of any of the EO individually. In this thesis, unprecedented information is presented regarding the use of EO from native species from Argentina as ruminal fermentation modifiers. The EO from LT and TM are effective in reducing methane production *in vitro*, with slight or no effects on the digestibility of the substrate at an adequate dose (depending on the substrate and the type of fermentation system). The differences between these two EO suggest their mechanisms of action differ, and that they may act over different microbial populations. The essential oils from *Lippia turbinata* and *Tagetes minuta* can be considered as promising candidates for the development of new feed additives in ruminant nutrition as a strategy to mitigate enteric methane production.

**Key words:** climate change, ruminants, bioactive compounds, ruminal fermentation.

# TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	X
<b>CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>GANADERÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO</b>	<b>1</b>
Importancia de la ganadería	1
Contribución del ganado al cambio climático	2
<b>EL METANO EN EL RUMEN</b>	<b>3</b>
Alternativas para disminuir la metanogénesis	4
Aceites esenciales	5
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO II EVALUACIONES EXPLORATORIAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS NATIVAS DE ARGENTINA</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
Diseño experimental	12
Aceites esenciales	13
Incubación <i>in vitro</i>	14
Análisis y determinaciones químicas	16
Análisis estadístico	18
<b>RESULTADOS</b>	<b>19</b>
Composición química de los aceites esenciales	19
Etapa exploratoria inicial	21
Ajuste de rango de dosis	24
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>36</b>
<b>CAPÍTULO III EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>LIPPIA TURBINATA</i> Y <i>TAGETES MINUTA</i> SEGÚN EL SUSTRATO INCUBADO</b>	<b>37</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
Diseño experimental	39
Aceites esenciales	39



Sustratos	40
Incubación <i>in vitro</i>	40
Análisis y determinaciones químicas	41
Análisis estadístico	43
<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
Composición química de los aceites esenciales	45
Efecto de los aceites esenciales sobre la fermentación	45
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO IV PERSISTENCIA DE LOS EFECTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>LIPPIA TURBINATA</i> Y <i>TAGETES MINUTA</i> SOBRE CULTIVOS SEMI-CONTINUOS</b>	<b>61</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
Diseño experimental	63
Aceites esenciales	63
Período experimental	64
Fermentadores semi-continuos	64
Mediciones, toma y análisis de muestras	66
Análisis estadístico	67
<b>RESULTADOS</b>	<b>68</b>
Composición química de los aceites esenciales	68
Metano, producción de gas y digestibilidad del sustrato	68
Parámetros de fermentación	72
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>81</b>
<b>CAPÍTULO V SÍNTESIS Y CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>82</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>99</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 2.1.</b>	Aceites esenciales de distintas especies vegetales y dosis evaluadas en el ensayo 2.	13
<b>Tabla 2.2.</b>	Composición química (g/kg MS) del heno de alfalfa y del grano de maíz usados como sustratos para la fermentación ruminal <i>in vitro</i> .	15
<b>Tabla 2.3.</b>	Caracterización del perfil químico de los aceites esenciales evaluados.	19
<b>Tabla 2.4.</b>	Producción de gas total, de metano y digestibilidad de la fibra con un rango de dosis uniforme para los aceites esenciales evaluados (ensayo 1).	22
<b>Tabla 2.5.</b>	Producción de gas total, de metano y digestibilidad de la fibra con un rango de dosis específico para cada aceite esencial (ensayo 2).	26
<b>Tabla 3.1.</b>	Proporción de componentes y composición química de los sustratos representantes de dietas de sistema de producción bovina y del sustrato estándar de determinaciones de laboratorio utilizados para la fermentación ruminal <i>in vitro</i> .	41
<b>Tabla 3.2.</b>	Composición química de los aceites esenciales de <i>Lippia turbinata</i> y <i>Tagetes minuta</i> evaluados.	46
<b>Tabla 3.3.</b>	Efecto de dosis crecientes de aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> sobre la producción de gas total y de metano, sobre la digestibilidad de la materia orgánica y de la fibra en la fermentación <i>in vitro</i> de sustratos representativos de dietas de sistemas de producción ganadera y de un sustrato estándar de laboratorio.	48
<b>Tabla 3.4.</b>	Efecto de dosis crecientes de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> sobre la producción de gas total y de metano, sobre la digestibilidad de la materia orgánica y de la fibra en la fermentación <i>in vitro</i> de sustratos representativos de dietas de sistemas de producción ganadera y de un sustrato estándar de laboratorio.	50
<b>Tabla 4.1.</b>	Efecto de la adición de aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> (LT), <i>Tagetes minuta</i> (TM) o su uso rotativo (TM/LT) sobre el metano, la producción de gas total y la digestibilidad del sustrato fermentado en un Rusitec.	70
<b>Tabla 4.2.</b>	Efecto de la adición de aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> (LT), <i>Tagetes minuta</i> (TM) o su uso rotativo (TM/LT) sobre los parámetros de fermentación evaluados en el Rusitec.	73

## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig. 2.1.</b>	Reducción relativa al control de la producción de metano (mg/g FDNmo d) y de la digestibilidad de la fibra (D-FDNmo, g/g) debida al agregado de aceites esenciales (•) y de monensina (o) en el ensayo 1.	24
<b>Fig. 2.2.</b>	Reducción relativa al control de la producción de metano (mg/g FDNmo d) y de la digestibilidad de la fibra (D-FDNmo, g/g) debida al agregado de aceites esenciales (•) y de monensina (o) en el ensayo 2.	28
<b>Fig. 3.1.</b>	Promedio de pH correspondiente al tratamiento de dosis cero de cada sustrato (A) y efecto del agregado de dosis crecientes de <i>Lippia turbinata</i> en los distintos sustratos evaluados: B) estándar; C) cría; D) recria; E) engorde y F) tambo.	49
<b>Fig. 3.2.</b>	Reducción relativa a la dosis cero (sin AE) para: A) producción de gas total; B) producción de metano; C) digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y D) digestibilidad de la fibra en detergente neutro libre de cenizas, con dosis crecientes de aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> en la fermentación <i>in vitro</i> de sustratos representantes de dietas de sistemas de producción ganadera.	52
<b>Fig. 3.3.</b>	Reducción relativa a la dosis cero (sin AE) para: A) producción de gas total; B) producción de metano; C) digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y D) digestibilidad de la fibra en detergente neutro libre de cenizas, con dosis crecientes de aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> en la fermentación <i>in vitro</i> de sustratos representantes de dietas de sistemas de producción ganadera.	53
<b>Fig. 4.1.</b>	Efecto del agregado de aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> (LT), <i>Tagetes minuta</i> (TM) y su uso rotativo (TM/LT) sobre la concentración de metano en el gas total producido en un período de 24 hs (A), la producción de gas total (B) y la digestibilidad aparente de la materia seca en 48 hs de incubación (C).	71
<b>Fig. 4.2.</b>	Efecto del agregado de aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> (LT), <i>Tagetes minuta</i> (TM) y su uso rotativo (TM/LT) sobre la concentración de amoníaco (A) y el pH pre y post-alimentación (B y C) en el fluido ruminal.	74
<b>Fig. 5.1.</b>	Reducción relativa respecto al control (tratamiento sin AE) para: A) producción de metano y B) digestibilidad de la fibra en detergente neutro, para las dosis evaluadas en todos los ensayos <i>in vitro</i> realizados con el aceite esencial de <i>Lippia turbinata</i> .	85
<b>Fig. 5.2.</b>	Reducción relativa respecto al control (tratamiento sin AE) para: A) producción de metano y B) digestibilidad de la fibra en detergente neutro, para las dosis evaluadas en todos los ensayos <i>in vitro</i> realizados con el aceite esencial de <i>Tagetes minuta</i> .	86

## Lista de abreviaturas

AE	aceites esenciales
AGV	ácidos grasos volátiles
CG	cromatografía gaseosa
CG-EM	cromatografía gaseosa acoplado a espectro de masa
CR	contenido ruminal
D-FDN <sub>mo</sub>	digestibilidad de la fibra en detergente neutro libre de cenizas
DGC	Di Rienzo, Guzman y Casanoves
DMS <sub>iv</sub>	digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
DMO	digestibilidad de la materia orgánica
ec.	ecotipo
FCA – UNC	Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba
FDA	fibra en detergente ácido
aFDN	fibra en detergente neutro
aFDN <sub>mo</sub>	fibra en detergente neutro libre de cenizas
FDN <sub>mo</sub> d	fibra en detergente neutro libre de cenizas digeridos
FR	fluido ruminal
GEI	gases de efecto invernadero
hs	horas
LT	<i>Lippia turbinata</i>
MS	materia seca
MO	materia orgánica
PB	proteína bruta
Rusitec	<i>Rumen simulation technique</i>
TM	<i>Tagetes minuta</i>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### GANADERÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO

#### **Importancia de la ganadería**

El ganado representa una importante función en varias dimensiones relacionadas a la seguridad alimentaria y al desarrollo territorial, ya que garantiza la provisión de alimento, genera ingresos, provee empleo y presta una serie de servicios sociales y ambientales que son claves para el desarrollo sostenible (FAO, 2012). Los rumiantes pueden producir alimento de alto valor nutricional (carne y leche) y esencial para la dieta humana a partir de un recurso alimenticio que no es aprovechable por el hombre (Opio *et al.*, 2013). Por otro lado, la División de Población de las Naciones Unidas (2017) estima que la población mundial se incrementará cerca de un 30% para el año 2050, y con ello, la demanda de productos pecuarios aumentará considerablemente.

Latinoamérica tiene una posición destacada como proveedor de proteína animal para responder a esta demanda creciente de alimentos (Ribeiro Pereira *et al.*, 2015). Dentro de la región, Argentina tiene uno de los rodeos más numerosos, con alrededor de 51 millones de cabezas, y es un productor de carnes de reconocida calidad a nivel internacional. La actividad ganadera tiene gran importancia dentro de la economía del país, ya que genera valor agregado en las zonas donde se produce. Además, está fuertemente arraigada en su historia, la cual se remonta al siglo XVII, convirtiendo a la Argentina en un país con gran tradición ganadera.

## **Contribución del ganado al cambio climático**

El cambio climático es uno de los mayores desafíos que la humanidad debe enfrentar (Steinfeld *et al.*, 2006), ya que constituye una importante amenaza para la supervivencia de muchas especies, para los ecosistemas, así como para la sostenibilidad de los sistemas de producción en muchas partes del mundo (Moumen *et al.*, 2016). Una de las principales causas de este problema está asociada al aumento acelerado de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) desde la era industrial al presente, por lo que toma relevancia el estudio de sus fuentes para diseñar estrategias para su mitigación (IPCC, 2013).

El sector ganadero es señalado como una de las principales fuentes de GEI a nivel mundial, el que representa un 14,5% del total de los GEI que se emite (Gerber *et al.*, 2013). Los principales gases que emite el sector son el óxido nitroso, el metano y el dióxido de carbono, los que implican una pérdida de nitrógeno, energía y materia orgánica que afectan la eficiencia de uso de los nutrientes y la productividad del sistema. Entre ellos, el gas más emitido es el metano, que representa alrededor del 47% de las emisiones del sector ganadero a nivel mundial (Opio *et al.*, 2013). El metano tiene una persistencia de 9 a 15 años en la atmósfera, por lo que su poder de calentamiento es 28 veces mayor que el del dióxido de carbono (IPCC, 2013). En Argentina, la agricultura y la ganadería representan casi un tercio de las emisiones de GEI del país, de los cuales cerca del 40% se debe a la producción de metano por parte de los rumiantes (Tercer Comunicación Nacional sobre Cambio Climático, 2015).

La preocupación de la opinión pública por la calidad y el cuidado del ambiente se ha incrementado en los últimos años, lo que lleva a los sectores productivos a la necesidad de repensar las formas de producir. A pesar de que Argentina no está entre los países que más GEI emite, la presión de la opinión pública sobre la forma en que se deberían generar los productos alimenticios que consumen, puede provocar que a futuro el nivel de emisiones relacionadas a la ganadería se constituya en una barrera que dificulte el comercio internacional, afectando a países agro-exportadores como Argentina. En

conclusión, el sector ganadero mundial se enfrenta a un triple desafío: la necesidad de aumentar la producción para satisfacer la demanda creciente, adaptarse a un entorno económico y natural cada vez más variable e impredecible y, al mismo tiempo, mejorar su desempeño ambiental (Opio *et al.*, 2013).

## **EL METANO EN EL RUMEN**

El metano se genera en el proceso de la fermentación del alimento en el rumen. Los rumiantes en sí mismos no tienen la capacidad de sintetizar las enzimas necesarias para degradar los polisacáridos más complejos de las plantas, pero el rumen provee el ambiente necesario para el desarrollo de un consorcio, diverso y complejo, de microorganismos anaeróbicos que llevan a cabo ese rol metabólico (Henderson *et al.*, 2015). El rumen provee entonces el ambiente necesario (temperatura, pH y anaerobiosis) para el desarrollo de los microorganismos, y éstos fermentan el alimento. Los productos principales de esta fermentación son los ácidos grasos volátiles (AGV) y las células microbianas, los cuales son utilizados por el rumiante como fuente de energía y aminoácidos (Jaurena *et al.*, 2014).

La fermentación es un proceso oxidativo durante el cual los co-factores reducidos deben ser re-oxidados a través de reacciones de dehidrogenación para que el proceso continúe, liberando hidrógenos en el rumen (McAllister *et al.*, 1996). En el metano, el átomo de carbono está en su forma más reducida, y por lo tanto su síntesis resulta en un destino ideal para los electrones en ambientes fuertemente reductores (Weimer, 2015). Dentro del ecosistema ruminal, los microorganismos metanogénicos sintetizan metano a partir de dióxido de carbono e hidrógeno, contribuyendo a mantener el balance entre hidrogeniones (McAllister *et al.*, 1996).

Los microorganismos metanogénicos pertenecen al dominio de las *Archaea*, un grupo distintivo de las Eubacterias, las cuales utilizan el hidrógeno metabólico como

fuente de energía (McAllister y Newbold, 2008). Estos microorganismos tienen diferencias morfológicas y funcionales con el resto de los microorganismos del rumen, lo que sugiere la posibilidad de que los metanogénicos sean selectivamente inhibidos, o estimulados, a través de la manipulación de la actividad ruminal con compuestos que exploten estas diferencias (Bodas *et al.*, 2012).

## **Alternativas para disminuir la metanogénesis**

Reducir la producción de metano es beneficioso tanto desde un punto de vista ambiental, por reducir la contribución de GEI del sector; como nutricional, ya que permite mejorar la eficiencia de uso de la energía del alimento y con ello, la productividad (Steinfeld *et al.*, 2006). Existen diversas estrategias para mitigar la producción de metano de rumiantes. Algunas de ellas apuntan a mejorar el manejo del alimento y de la alimentación, a través del manejo del pastoreo, de mejorar la calidad del forraje y/o del uso de concentrados. Otras estrategias intentan cambiar la estructura y/o actividad de los microorganismos del rumen, ya sea a través de modificadores de la fermentación o por la incorporación de microorganismos considerados como pro-bióticos (Beauchemin *et al.*, 2008; Gerber *et al.*, 2013; Hristov *et al.*, 2013; Jeyanathan *et al.*, 2014).

Los antibióticos han sido muy utilizados para modificar la fermentación en el rumen y mejorar así la eficiencia de aprovechamiento de los nutrientes del alimento. Entre ellos, la monensina es un antibiótico del grupo de los ionóforos que se utiliza como promotor del crecimiento y que tiene gran capacidad para reducir la producción de metano (Ranga Niroshan Appuhamy *et al.*, 2013). Sin embargo, la administración de antibióticos utilizados para aumentar la eficiencia de producción son cada vez más cuestionados, debido a la posibilidad de la generación de resistencia microbiana, por lo que van perdiendo aceptación de parte de los consumidores (Robinson *et al.*, 2017). Como consecuencia, su uso en la alimentación animal ha sido prohibido en algunos países (Reglamento 1831/2003/CE), y está en revisión en otros, por lo que es necesaria la búsqueda de alternativas que sean más aceptables para los consumidores.



Existen productos naturales que tienen actividad antimicrobiana, como los metabolitos secundarios de las plantas, y que han demostrado ser efectivos para manipular la producción de metano en el rumen (Banik *et al.*, 2016). Entre los compuestos obtenidos a partir de plantas, los aceites esenciales (AE) brindan una buena oportunidad para el desarrollo de aditivos que permitan mitigar la emisión de metano de rumiantes como una propuesta más “amigable” con el ambiente (Benchaar y Greathead, 2011).

## **Aceites esenciales**

Los AE son compuestos aromáticos volátiles, en su mayoría lipofílicos, que se obtienen por hidrodestilación de las plantas (Bakkali *et al.*, 2008). En la naturaleza, desempeñan un papel importante en la protección de las plantas ya que poseen actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica e insecticida, por lo que sus estructuras se han moldeado para interactuar con distintos objetivos celulares (Acamovic y Brooker, 2005).

Son mezclas naturales muy complejas que pueden contener alrededor de 20-60 compuestos (Dewick, 2002; Bakkali *et al.*, 2008). Los principales componentes pertenecen a la familia de los terpenos, siendo los monoterpenos (10 carbonos) los que se encuentran en mayor proporción, seguidos de los sesquiterpenos (15 carbonos). Los monoterpenos se forman de la unión de dos unidades de isopreno (5 carbonos) y son las moléculas más representativas llegando a constituir hasta el 90% de los AE. Constituyen distintos grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, epóxidos, éteres y fenoles, entre otros (Dewick, 2002; Bakkali *et al.*, 2008).

Si bien no se conoce exactamente su mecanismo de acción, se ha propuesto que su citotoxicidad se basa en su acción sobre la membrana fosfolipídica (Trombetta *et al.*, 2005). Gracias a su propiedad lipofílica y al pequeño tamaño de sus componentes, pueden interactuar y atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática (Bakkali *et al.*, 2008). Dorman y Deans (2000) reportaron además acción sobre componentes nitrogenados vitales para la célula, como proteínas y nucleótidos, lo que genera interferencia con

procesos biológicos celulares y provoca la pérdida de su funcionalidad.

En un número considerable de estudios se ha demostrado la capacidad de los AE para modificar la fermentación ruminal y reducir la producción de metano (Benchaar y Greathead, 2011; Khiaosa-Ard y Zebeli, 2013). Sin embargo, los resultados reportados respecto al uso de AE en la fermentación ruminal son variables e inconsistentes. En general, las discrepancias encontradas entre los distintos estudios se pueden atribuir a: las condiciones experimentales (*in vitro* - *in situ* - *in vivo*), el tipo y/o dosis de AE y la composición de la dieta base (Newbold *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2007; Klevenhusen *et al.*, 2012; Khiaosa-Ard y Zebeli, 2013). Por otro lado, algunos estudios han reportado que los microorganismos tienen la capacidad de adaptarse a los AE, provocando una disminución o pérdida de su efectividad, lo que podría constituir una limitante para su uso (Cardozo *et al.*, 2004; Castillejos *et al.*, 2007). Si bien la evaluación de los AE en el área de la nutrición de rumiantes tiene ya un largo camino recorrido, sus efectos como modificadores de la fermentación no son claros aún, por lo que se requieren más estudios para comprender sus mecanismos de acción.

Para finalizar, existen AE de plantas nativas de Argentina que tienen la capacidad de regular una gran variedad de procesos biológicos (Juliani *et al.*, 2004). Los AE de *Tessaria absinthioides*, *Baccharis coridifolia*, *Heterotheca latifolia*, *Aloysia gratissima*, *Eupatorium patens*, *Lippia juneliana*, *L. integrifolia* y *L. turbinata* tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de *Ascospaera apis*, agente causal de micosis en larvas de *Apis mellifera* (Dellacasa *et al.*, 2003). Los AE de *Acantholippia seriphioides*, *L. turbinata*, *Minthostachys mollis*, *Schinus molle* y *Tagetes minuta* mostraron efectividad para el control de *Paenibacillus larvae larvae*, bacteria que genera una de las enfermedades más importantes de la apicultura. El AE de *T. minuta* ha mostrado efectividad sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Tereschuk *et al.*, 1997). Algunos AE han sido incluso efectivos contra nemátodos, como es el caso de los AE de *A. gratissima*, *A. polystachya*, *A. triphylla*, *L. juneliana*, *L. turbinata* y *H. latifolia* (Duschatzky *et al.*, 2004). También se ha reportado acción insecticida, como en el caso de los AE de *M. verticillata* y *Hedeoma multiflora* que han mostrado resultados promisorios en el control de *Musca domestica*

(Palacios *et al.*, 2009). Se cuenta con información sobre la acción antimicrobiana, antifúngica e insecticida de los AE de plantas nativas de Argentina. Sin embargo, no se conoce aún su potencial para modular la actividad microbiana ruminal, por lo que resulta de interés explorar su acción en el área de la nutrición de rumiantes.

Por lo expuesto, este trabajo de tesis buscó responder a los siguientes interrogantes:

- *Los aceites esenciales de plantas nativas de Argentina que han mostrado actividad antimicrobiana, ¿tendrán la capacidad de modular la actividad microbiana en el rumen?*
- *Si es así, ¿qué dosis serán efectivas para lograr la disminución de la producción de metano sin que implique un perjuicio para el aprovechamiento del alimento?*
- *¿En qué sistema de producción se podrían implementar como estrategia de mitigación de metano de rumiantes?*
- *¿Tendrán la capacidad de generar una respuesta cuyos efectos perduren en el tiempo?*

## **HIPÓTESIS**

La inclusión de aceites esenciales inhibe la producción de metano entérico debido a la acción antimicrobiana que ejercen de manera selectiva sobre ciertos microorganismos ruminales. Su composición química condiciona la magnitud de dicha inhibición, y el uso alternado de dos o más aceites esenciales con diferente composición permite sostener en el tiempo su acción antimetanogénica al reducir las posibilidades de adaptación microbiana.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el uso de algunos aceites esenciales de plantas nativas de Argentina como fuentes naturales de aditivos para la alimentación de rumiantes con el fin de disminuir la producción de metano entérico.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar aceites esenciales de plantas nativas de Argentina y rango de dosis en las que tengan la capacidad de disminuir la producción de metano durante la fermentación ruminal *in vitro* sin afectar la digestibilidad del sustrato.

2. Evaluar la capacidad de los aceites esenciales seleccionados en la etapa exploratoria para reducir la producción de metano en la fermentación ruminal *in vitro* de sustratos con distinto valor nutritivo.

3. Estudiar en un sistema *in vitro* de cultivo semi-continuo la persistencia de la capacidad antimetanogénica de los aceites esenciales más promisorios.

# EVALUACIONES EXPLORATORIAS DE ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS NATIVAS DE ARGENTINA

## INTRODUCCIÓN

En un número considerable de estudios se ha demostrado la capacidad de los AE para modificar la fermentación ruminal para reducir la producción de metano (Benchaar y Greathead, 2011; Khiaosa-ard y Zebeli, 2013). Sin embargo, su eficacia para manipular la actividad de los microorganismos ruminales no es estable aún, ya que existe una serie de factores que afectan su bioactividad en el ecosistema ruminal. Debido a la gran variabilidad de composición química que se puede encontrar entre diferentes AE, uno de los principales factores que condiciona su respuesta es la especie de planta de la que se obtienen (Bodas *et al.*, 2012). Esta complejidad les confiere la capacidad de interactuar con diferentes objetivos moleculares y celulares, y de esta forma desencadenar una respuesta en uno o varios blancos (Calsamiglia *et al.*, 2007). El estudio de nuevos compuestos o de nuevos usos de compuestos ya existentes aún no explorados en el área de la nutrición de rumiantes, resulta esencial para identificar nuevos aditivos con potencial beneficio en la modulación de la actividad microbiana ruminal (Acamovic y Brooker, 2005).

Los AE de plantas nativas de Argentina han demostrado tener actividad antimicrobiana, antifúngica y biocida, lo que les confiere la capacidad de modular una gran variedad de procesos biológicos. Sin embargo, hasta el momento no se cuenta con información sobre su capacidad para modificar la fermentación ruminal. El objetivo de

este capítulo fue identificar AE de plantas nativas de Argentina que tengan la capacidad de disminuir la producción de metano durante la fermentación ruminal *in vitro*, en comparación con otros AE que ya han sido evaluados como modificadores de la fermentación ruminal.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Diseño experimental

Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* para seleccionar la combinación de AE y dosis que resulte más efectivo para reducir la producción de metano sin afectar la digestibilidad del sustrato. Se realizaron dos ensayos consecutivos con la misma metodología, excepto por algunas diferencias que se especifican en cada caso. Las plantas nativas de Argentina se seleccionaron por su facilidad de recolección, su rendimiento en AE y por su probada capacidad antimicrobiana, las cuales fueron: *Aloysia gratissima* (Dellacasa *et al.*, 2003), *Lippia turbinata* (Dellacasa *et al.*, 2003; Fuselli *et al.*, 2006), *Schinus molle* (Fuselli *et al.*, 2006) y *Tagetes minuta* (Tereschuk *et al.*, 1997; Fuselli *et al.*, 2006). Los AE de plantas no nativas seleccionados fueron aquellos con probada efectividad para modular la actividad microbiana ruminal: *Eucalyptus globulus* (Hristov *et al.*, 2008), *Mentha x piperita* var. *vulgaris* (Ando *et al.*, 2003; Hristov *et al.*, 2008), *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (dos ecotipos: compacto y mendocino) (Cardozo *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2007; Hristov *et al.*, 2008; Macheboeuf *et al.*, 2008), *Rosmarinus officinalis* (Castillejos *et al.*, 2007; Hristov *et al.*, 2008) y *Thymus vulgaris* (Castillejos *et al.*, 2007; Hristov *et al.*, 2008; Macheboeuf *et al.*, 2008).

En una primer etapa, los diez AE se evaluaron en un mismo rango de dosis: 1, 10, 100 y 1000 mg/l, el cual se seleccionó en función de trabajos exploratorios con AE reportados en la bibliografía (Busquet *et al.*, 2005; Cardozo *et al.*, 2005; Castillejos *et al.*, 2006; Castillejos *et al.*, 2007). En base a los resultados del primer ensayo, se definió un rango de dosis más estrecho y específico para cada uno de los AE evaluados (Tabla 2.1). Para la selección de las dosis se evaluó la magnitud de la reducción de la producción de metano y de la digestibilidad obtenida con cada AE en el rango de dosis de la primera etapa. Se observó en qué dosis habían sido efectivos para disminuir la producción de metano y que no haya disminuido más de un 10% la digestión.

En ambos ensayos se incluyeron además un control negativo (sin AE) y como



control positivo se utilizó el antibiótico monensina (Option 20%, Brascorp S.A., Buenos Aires, Argentina) a 1,87 mg de monensina pura/l, según lo sugerido por Araujo *et al.* (2011). Se utilizó un diseño en bloques completos al azar que consideró las incubaciones como bloques (repeticiones), realizadas en tres semanas consecutivas. Dentro de cada bloque, los tratamientos se realizaron por duplicado y se consideraron como réplicas.

Tabla 2.1. Aceites esenciales de distintas especies vegetales y dosis evaluadas en el ensayo 2.

Espece	Dosis (mg/l)			
Plantas nativas de Argentina				
<i>Aloysia gratissima</i>	50	100	150	300
<i>Lippia turbinata</i>	30	60	120	240
<i>Schinus molle</i>	75	150	300	600
<i>Tagetes minuta</i>	5	50	125	250
Plantas no nativas de Argentina				
<i>Eucalyptus globulus</i>	5	50	150	300
<i>Mentha x piperita</i> var. <i>vulgaris</i>	50	100	200	400
<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> ec. C.	0,5	5	50	250
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> ec. M.	50	150	250	350
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	300	500	700
<i>Thymus vulgaris</i>	5	50	150	300

ec.: ecotipo; C.: compacto; M.: mendocino

## Aceites esenciales

Las plantas nativas de Argentina: *A. gratissima*, *L. turbinata* y *T. minuta* se recolectaron en Characato, Córdoba (31°28'77" S, 64°12'32" O) y *S. molle* se obtuvo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Córdoba (FCA – UNC; 31°44'06" S, 64°18'48" O). Las plantas no nativas de Argentina: *E. globulus*, *M. x piperita* var. *vulgaris*, *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. compacto y ec. mendocino, *R. officinalis* y *T. vulgaris* fueron obtenidas de productores de Villa Dolores, Córdoba (31°56'67" S, 65°11'53" O) y de la FCA – UNC.

Se cosechó la parte aérea de las plantas en plena floración (momento de mayor concentración de AE), se secaron a temperatura ambiente y el AE se extrajo por hidrodestilación (Zygodlo y Juliani, 2003) en un aparato de vidrio tipo Clevenger. Se agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar posibles remanentes de agua y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  en ausencia de luz hasta posterior análisis. La composición de los AE se analizó por cromatografía gaseosa acoplado a un espectro de masa (CG-EM) utilizando un equipo Perkin Elmer Clarus 600 (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), equipado con una columna polar, Supelcowax 10 (30 m x 0,25  $\mu\text{m}$ ) y luego una columna apolar, DB-5 (30 m x 0,25  $\mu\text{m}$ ), con helio como gas portador. Las condiciones para ambas columnas fueron: temperatura inicial de  $60^{\circ}\text{C}$  por tres minutos, rampa de  $4^{\circ}\text{C}$  por minuto, hasta los  $240^{\circ}\text{C}$  y temperatura del inyector  $250^{\circ}\text{C}$ . La identificación de los compuestos se realizó utilizando la base de datos NIST (versión 3.0), la base de datos de espectros de masas disponibles en la FCA – UNC y otros disponibles en la bibliografía (Adams, 1995). La proporción de cada componente se calculó dividiendo el área de su pico respecto de la sumatoria del área de todos los compuestos detectados.

### ***Incubación in vitro***

El fluido ruminal (FR) se obtuvo de tres novillos Hereford canulados en rumen y recolectado una hora antes del inicio del experimento, previo a la alimentación de los animales. La dieta de los novillos fue 9,1 kg de heno de alfalfa y 2,3 kg de grano de maíz, en una relación 80:20 en base materia seca (MS). El FR se colectó e inmediatamente se transportó al laboratorio en termos precalentados con agua caliente. Una vez en el laboratorio, todas las manipulaciones se realizaron bajo condiciones de anaerobiosis (constante infusión de dióxido de carbono) y con temperatura constante ( $39^{\circ}\text{C}$ ). El FR de los tres novillos fue mezclado y homogeneizado en licuadora durante un minuto, luego se filtró dos veces a través de dos telas de quesería y se recolectó en un matraz. El pH inicial del FR fue  $6,55 \pm 0,077$  en el primer ensayo y  $6,55 \pm 0,081$  en el segundo. Durante la inoculación en los frascos de fermentación, el FR se mantuvo homogeneizado a través de un agitador magnético, a una temperatura de  $39^{\circ}\text{C}$  en baño maría y bajo constante infusión de dióxido de carbono.

El sustrato utilizado (total 0,5 g) fue una mezcla de 0,4 g de heno de alfalfa y 0,1 g de grano de maíz (Tabla 2.2), previamente liofilizados y molidos (malla: 2 mm). La fermentación se realizó en frascos de 100 ml, con 10 ml de FR y 40 ml de *buffer* fosfato/carbonato. Se prepararon soluciones de monensina y de cada AE en etanol a la concentración necesaria para lograr la dosis final en el medio de incubación, y se inocularon 200 µl de esta solución inmediatamente antes de agregar el FR. En los frascos del control se agregó una cantidad equivalente de etanol. Luego de la inoculación del FR se insufló dióxido de carbono dentro de los frascos durante cinco segundos, se taparon inmediatamente con tapones de goma y septos de aluminio y se colocaron en baño maría a 39°C. Se incluyó un blanco (FR y *buffer*, sin sustrato) para luego corregir la producción de gas y la digestibilidad. El total de frascos incubados en cada semana fue 86, correspondiendo a los 42 tratamientos (10 AE x 4 dosis + 2 controles), más el blanco, cada uno con sus réplicas (2). A intervalos reguales se midió la presión interna de los frascos utilizando un transductor de presión (Sper Scientific Ltd., Scottsdale, Arizona, Estados Unidos). Luego de cada lectura, los frascos se agitaron manualmente. La duración de la incubación fue de 48 hs en el primer ensayo y de 72 hs en el segundo. Al final de la incubación los frascos se colocaron en agua helada para detener la fermentación y se conservaron a -20°C hasta posterior determinación de digestibilidad de la fibra.

Tabla 2.2. Composición química (g/kg MS) del heno de alfalfa y del grano de maíz usados como sustratos para la fermentación ruminal *in vitro*.

	MO	PB	aFDN	FDA	DMS <sub>iv</sub>
Alfalfa	891	190	453	316	643
Maíz	985	83	159	34	871

MO: Materia orgánica; PB: Proteína bruta; aFDN: Fibra en detergente neutro; FDA: Fibra en detergente ácido; DMS<sub>iv</sub>: Digestibilidad *in vitro* de la materia seca.

## **Análisis y determinaciones químicas**

### *a) Determinaciones químicas sobre el sustrato*

El sustrato se analizó para determinar: materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fracción de fibra insoluble en detergente neutro (aFDN), fracción de fibra insoluble en detergente ácido (FDA) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DMS<sub>iv</sub>). El contenido de MO se determinó por incineración completa en mufla a 550°C durante 6 hs. La PB se determinó a través del método de Kjeldahl (AOCS: 954.01, 1998). El análisis de aFDN se realizó con el agregado de  $\alpha$ -amilasa y la FDA se determinó de forma secuencial luego de la determinación de aFDN, según Goering y Van Soest (1970), con un analizador de fibra ANKOM<sup>200</sup> (Ankom®, Tech. Co., Fairport, Nueva York, Estados Unidos) y se informaron incluyendo a las cenizas insolubles. La DMS<sub>iv</sub> se realizó según Tilley y Terry (1963) utilizando una incubadora Daisy<sup>II</sup> (Ankom®, Tech. Co. Fairport, Nueva York, Estados Unidos).

### *b) Producción de gas y metano*

En el primer ensayo la presión interna de los frascos se midió a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 24, 32, 40 y 48 hs de iniciada la fermentación y en el segundo ensayo se agregaron los horarios: 56, 64 y 72 hs. A través de una ecuación que relaciona presión y volumen se estimó el volumen de gas producido a cada horario. Dicha ecuación se obtuvo en una etapa previa, en la que se colocó a fermentar 0,5 g de sustrato (80:20 heno de alfalfa: grano de maíz) con 10 ml de FR y 40 ml de *buffer* en frascos de 100 ml, registrando los valores de presión y midiendo el volumen hasta llevar la presión interna a 0 psi. A través de regresión lineal se analizó la relación entre ambas variables. La relación obtenida fue:  $\text{Volumen}_{(\text{ml})} = 4,905 (\pm 0,033) \times \text{Presión}_{(\text{psi})} + 0,543 (\pm 0,095)$  ( $n = 629$ ,  $R^2 = 0,972$ ;  $\text{ECMP} = 1,386$ ). La producción de gas acumulado al final de la fermentación se calculó como la suma de los volúmenes producidos a cada horario, previa corrección por la producción de gas del blanco. El volumen de gas acumulado por frasco se corrigió por g de MO incubada y por g de FDN degradados.

La producción de metano se calculó a partir de la producción de gas acumulada al final de la incubación y la concentración de metano. En el primer ensayo se realizó una

muestra compuesta de gas que se recolectó en viales herméticamente cerrados (Labco Exetainer®, Lampeter, Gales, Reino Unido). Se tomaron alícuotas del gas producido en cinco horarios de lectura de presión (3,5, 3,5, 2,5, 1 y 0,5 ml a las 6, 12, 18, 24 y 48 hs, respectivamente) previamente seleccionados en función del patrón de fermentación observado en el ensayo preliminar. El resto del gas se liberó para evitar que la presión interna llegue a 7,0 psi, como ha sido sugerido por Theodorou *et al.* (1994). La concentración de metano se determinó por cromatografía gaseosa (CG) utilizando un equipo Shimadzu GC-9A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) equipado con una columna OV101 5% Cromosorb WAW (2,5 m x 3 mm) con nitrógeno como gas portador. La temperatura del inyector y del detector de ionización de llama fue de 280°C, mientras que la temperatura de la columna fue de 70°C.

En el segundo ensayo, para la determinación de metano se recolectó la totalidad del gas producido en viales de 250 ml herméticamente cerrados. La frecuencia de toma de muestras de gas dependió de la tasa de fermentación, procurando evitar que la presión interna llegue a 7,0 psi. La concentración se determinó por CG utilizando un equipo Hewlett Packard 4890 (HP Inc., Palo Alto, California, Estados Unidos) equipado con una columna analítica Porapak N 80/100 (2 m) y con nitrógeno como gas portador. La temperatura del inyector fue de 110°C, la del horno fue de 90°C y la temperatura del detector de ionización de llama fue de 250°C.

### *c) Digestibilidad de la fibra*

La digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro libre de cenizas (D-FDNmo) se obtuvo de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991); brevemente, el contenido de los frascos se transfirió a tubos de 200 ml, donde se agregaron 100 ml de solución de detergente neutro junto con  $\alpha$ -amilasa termoestable. Luego de una hora de ebullición, los residuos se filtraron en crisoles de peso conocido (DURAN® 25-851-32 DURAN Produktions GmbH & Co.; Hattenbergstr, Mainz, Alemania) y se secaron en horno a 105°C por 24 hs. Luego de pesar los residuos secos, se determinó el contenido de cenizas por incineración a 550°C por 4 hs. Se realizó el mismo procedimiento con el sustrato para

determinar la cantidad de fibra en detergente neutro libre de cenizas (FDNmo) incubada, y por diferencia con los g de FDNmo de los residuos (corregidos por el residuo del blanco) se calcularon los g de FDNmo digeridos (FDNmo d). La fórmula utilizada para el cálculo de la D-FDNmo fue:  $g \text{ FDNmo d} / g \text{ FDNmo incubada}$ .

### **Análisis estadístico**

Los datos de ambos ensayos se analizaron independientemente a través de un análisis de varianza con un diseño de bloques completos al azar, utilizando la plataforma R (DCOM) dentro del *software* InfoStat (2016). Se consideró como tratamiento a la combinación de cada AE ( $n = 10$ ) por dosis ( $n = 4$ ) y a los dos controles (negativo y positivo); y como bloques a las incubaciones. Para obtener el valor del bloque, se promediaron los valores de las réplicas (repeticiones dentro de cada incubación). Se utilizó un modelo lineal general y mixto que consideró los tratamientos como efectos fijos y a los bloques como efectos aleatorios:  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$ , donde  $Y_{ij}$  fue la observación,  $\mu$  fue la media general para cada parámetro,  $\tau_i$  fue el efecto del tratamiento ( $i = 1, \dots, 42$ ),  $\beta_j$  fue el efecto del bloque ( $j = 1, 2, 3$ ) y  $\varepsilon_{ij}$  fue el error residual. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con la prueba LSD de Fisher ( $\alpha = 0,05$ ).

## RESULTADOS

### Composición química de los aceites esenciales

La descripción de la composición química de los AE evaluados se muestra en la Tabla 2.3 y la caracterización completa de los compuestos detectados se encuentra en el Anexo 1. El número de componentes varió de cinco (*E. globulus*) a 24 (*O. vulgare*), mostrando una gran diferencia en los grupos funcionales detectados y en la proporción de cada componente. La mayoría de los compuestos fueron monoterpenos, seguidos de sesquiterpenos y sólo un fenilpropeno (anetol) presente en el AE de *S. molle* en baja proporción (2,4%).

Tabla 2.3. Caracterización del perfil químico de los aceites esenciales evaluados.

Característica	AG	EG	LT	MxP	OVc	OVm	RO	SM	TM	TV
Nº compuestos	21	5	11	12	13	24	19	21	9	18
Proporción de compuestos (%)										
Oxigenados	64	97	29	95	72	73	56	42	89	48
No oxigenados	36	3	71	5	28	27	44	58	11	52
Monoterpenos	64	100	97	98	99	96	95	69	95	96
Sesquiterpenos	36	0	3	2	1	4	5	29	5	4
Grupos químicos (%)										
Alcoholes	32	12	6	54	6	9	9	39	6	7
Ceto-alcoholes	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Cetonas	11	-	6	26	-	-	19	-	81	-
Epóxidos	9	-	6	-	-	-	-	-	2	1
Ésteres	-	8	8	3	-	1	1	-	-	2
Éteres	13	77	-	6	-	-	25	-	-	2
Éter-fenólicos	-	-	-	-	3	1	-	2	-	1
Fenoles	-	-	-	-	27	22	3	-	-	35
Furanos	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-
Hidrocarburos	36	3	71	5	28	27	44	58	11	52
Hidróxidos	-	-	-	-	35	41	-	-	-	-

AG: *Aloysia gratissima*; EG: *Eucalyptus globulus*; LT: *Lippia turbinata*; MxP: *Mentha × piperita* var. *vulgaris*; OVc: *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* ec. *compacto*; OVm: *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. *mendocino*; RO: *Rosmarinus officinalis*; SM: *Schinus molle*; TM: *Tagetes minuta*; TV: *Thymus vulgaris*.

En *A. gratissima* la presencia de alcoholes e hidrocarburos, los dos grupos más representativos, fue relativamente pareja (32 y 36% respectivamente). El principal grupo funcional de los componentes detectados en *L. turbinata*, *R. officinalis*, *S. molle* y *T. vulgaris* fueron hidrocarburos, representando el 71, 44, 58 y 52% del total de la composición respectivamente. En el AE de *E. globulus* el principal grupo químico fue un éster representado por la presencia de eucaliptol (77%). Mientras que en *M. x piperita* var. *vulgaris* primaron los alcoholes (54%) y en *T. minuta* las cetonas (81%). En ambos ecotipos de *O. vulgare* ssp. *hirtum* el principal grupo funcional fue el hidróxido, debido a la presencia de *cis* y *trans* hidro sabineno, seguido de hidrocarburos y fenoles.

Sumando todos los compuestos donde el oxígeno está presente, la proporción de compuestos oxigenados fue mayor al 85% en los AE de *E. globulus*, *M. x piperita* var. *vulgaris* y *T. minuta*. En *R. officinalis*, *A. gratissima* y ambos ecotipos de *O. vulgare* ssp. *hirtum* la proporción de compuestos oxigenados estuvo entre el 50 y 70%; mientras que en *L. turbinata*, *S. molle* y *T. vulgaris* fue menor al 50%.

En el AE de *A. gratissima* los principales componentes detectados fueron spatulenol (14%), eucaliptol (13%), óxido de cariofileno (9%) y crisantenona (8%). El principal componente detectado para *E. globulus*, representando el 77% del total, fue el eucaliptol. En *L. turbinata* el componente en mayor proporción fue limoneno (62%). Los dos principales componentes de *M. x piperita* var. *vulgaris* fueron el alcohol mentol (52%) y su variante cetónica, la mentona (24%); y en tercer lugar se detectó mentofurano (7%). En los ecotipos de *O. vulgare* ssp. *hirtum* los principales componentes fueron *trans* hidro sabineno (33% en compacto y 38% en mendocino) y timol (27% en compacto y 18% en mendocino). En *R. officinalis* también se detectó eucaliptol como principal componente (25%), seguido de  $\beta$  myrceno (21%) y camfor (14%). En *S. molle* se detectaron varios compuestos en proporciones similares: dehidroxy-isocalamendiol (19%),  $\alpha$  felandreno (14%), limoneno (14%), elemol (11%) y camfeno (9%). Los principales compuestos detectados para el AE de *T. minuta* fueron verbenona (42%), *cis* tagetona (28%), limoneno (6%) y *trans* tagetona (6%). En el AE de *T. vulgaris* los principales componentes detectados fueron timol (29%), p-cimeno (23%) y  $\gamma$  terpineno (17%).



## **Etapa exploratoria inicial**

El efecto de los AE sobre la producción de gas total, de metano y sobre la digestibilidad de la fibra correspondiente al primer ensayo se presenta en la Tabla 2.4. Para todas las variables en estudio, se observó una respuesta dosis-dependiente. Comparado al control, la monensina redujo la producción de gas total (17%) y de metano (42 y 49%, expresado por g MO y de g FDN d respectivamente), pero estuvo asociado a una reducción del 11% en la digestibilidad de la fibra. Un patrón similar, pero de mayor magnitud, se observó para las dosis más altas (1000 mg/l) de todos los AE estudiados, en los que la digestibilidad de la fibra fue reducida a más de la mitad, excepto por *E. globulus* donde la reducción fue del 42%.

Dosis bajas e intermedias de la mayoría de los compuestos no afectaron la producción de metano en relación a la MO incubada, a excepción de *A. gratissima* (100 mg/l) y *T. minuta* (10 y 100 mg/l), con los que se obtuvo una reducción de la producción de metano de alrededor del 30%, sin afectar la digestibilidad de la fibra. Con la dosis intermedia de *L. turbinata* (100 mg/l) se alcanzó un 85% de reducción de metano, asociado a un 6% de reducción de la digestibilidad. *E. globulus* (10 mg/l) y *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. compacto (1 mg/l) también redujeron la producción de metano expresada por g de FDN d (alrededor del 25%), sin afectar la digestibilidad de la fibra.

En la Figura 2.1 se puede observar la relación entre la reducción relativa al control de la producción de metano y la reducción relativa al control de la digestibilidad de la fibra. Se observa una nube de puntos en el extremo superior derecho los cuales corresponden con las dosis de 1000 mg/l de los diez AE, donde la reducción de metano superó el 80%, pero la digestibilidad de la fibra se redujo a la mitad. Por otro lado, las dosis intermedias (1, 10 y 100 mg/l) se distribuyeron más próximas al origen de los ejes, a excepción del punto correspondiente a la dosis de 100 mg/l de *L. turbinata*, en la que se obtuvo una disminución de más del 85% de la producción de metano, con menos del 10% de reducción de digestibilidad de la fibra.

Tabla 2.4. Producción de gas total, de metano y digestibilidad de la fibra con un rango de dosis uniforme para los aceites esenciales evaluados (ensayo 1).

Tratamientos	Dosis mg/l	Gas total		Metano			D-FDNmo <sup>2</sup>		
		ml/g MO		mg/g MO	mg/g FDNmo d <sup>1</sup>	g/g			
Control		289	abcd	56,5	abc	2,270	a	0,481	abc
Monensina	1,87	240	e	32,7	fg	1,168	e	0,426	e
<i>Aloysia gratissima</i>	1	290	abcd	48,4	abcde	1,922	abcd	0,467	abcd
	10	290	abcd	46,5	abcdef	1,862	abcd	0,479	abc
	100	288	abcd	37,6	efg	1,524	de	0,488	ab
	1000	172	fg	1,1	i	0,021	f	0,240	g
<i>Eucalyptus globulus</i>	1	288	abcd	50,1	abcde	1,999	abcd	0,479	abc
	10	293	abcd	43,5	bcdef	1,699	bcde	0,467	abcd
	100	296	abc	52,0	abcde	2,058	abcd	0,475	abcd
	1000	182	f	2,1	i	0,048	f	0,280	f
<i>Lippia turbinata</i>	1	291	abcd	47,7	abcde	1,914	abcd	0,480	abc
	10	293	abcd	51,1	abcde	2,003	abcd	0,465	abcd
	100	232	e	8,3	i	0,315	f	0,453	cde
	1000	157	h	0,3	i	0,005	f	0,194	ijk
<i>Mentha x piperita</i> var. <i>vulgaris</i>	1	297	ab	52,3	abcde	2,062	abcd	0,471	abcd
	10	288	abcd	53,5	abcd	2,040	abcd	0,461	abcd
	100	282	cd	48,3	abcde	1,882	abcd	0,459	abcde
	1000	135	i	13,1	ih	0,202	f	0,187	ijk
<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> (Comp.)	1	289	abcd	42,0	cdef	1,634	cde	0,461	abcd
	10	296	abc	51,5	abcde	2,002	abcd	0,472	abcd
	100	301	a	47,9	abcde	1,817	abcd	0,463	abcd
	1000	124	i	4,7	i	0,071	f	0,174	jk
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> (Mend.)	1	288	abcd	53,0	abcd	2,233	ab	0,491	a
	10	285	bcd	49,9	abcde	1,982	abcd	0,474	abcd
	100	287	abcd	49,5	abcde	1,864	abcd	0,444	de
	1000	98	j	3,8	i	0,058	f	0,173	jk
<i>Rosmarinus officinalis</i>	1	290	abcd	59,2	a	2,309	a	0,479	abc
	10	293	abcd	58,3	ab	2,338	a	0,478	abc
	100	296	abc	52,5	abcde	2,097	abc	0,481	abc
	1000	170	fgh	3,0	i	0,058	f	0,237	gh

Tabla 2.4. Producción de gas total, de metano y digestibilidad de la fibra con un rango de dosis uniforme para los aceites esenciales evaluados (ensayo 1). **Continuación.**

Tratamientos	Dosis mg/l	Gas total		Metano			D-FDNmo <sup>2</sup>		
		ml/g MO		mg/g MO	mg/g FDNmo d <sup>1</sup>		g/g		
<i>Schinus molle</i>	1	292	abcd	50,6	abcde	1,970	abcd	0,474	abcd
	10	292	abcd	51,3	abcde	2,059	abcd	0,478	abc
	100	280	d	50,5	abcde	1,941	abcd	0,461	abcd
	1000	182	f	25,9	gh	0,538	f	0,217	ghi
<i>Tagetes minuta</i>	1	288	abcd	46,0	abcdef	1,805	abcd	0,469	abcd
	10	297	ab	40,0	defg	1,545	cde	0,467	abcd
	100	286	bcd	40,4	defg	1,546	cde	0,459	abcde
	1000	160	gh	11,7	hi	0,204	f	0,205	hij
<i>Thymus vulgaris</i>	1	294	abcd	55,4	abc	2,243	ab	0,481	abc
	10	288	abcd	48,0	abcde	1,950	abcd	0,483	abc
	100	287	abcd	53,6	abcd	2,030	abcd	0,456	bcde
	1000	59	k	1,6	i	0,022	g	0,170	k
Error estándar		7,9		5,42		0,206		0,0129	
<i>P</i> -valor		< 0,001		< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre medias (LSD Fisher;  $P < 0,05$ ).  
<sup>1</sup>FDNmo d: fibra en detergente neutro libre de cenizas digerida; <sup>2</sup>D-FDNmo: Digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro libre de cenizas.

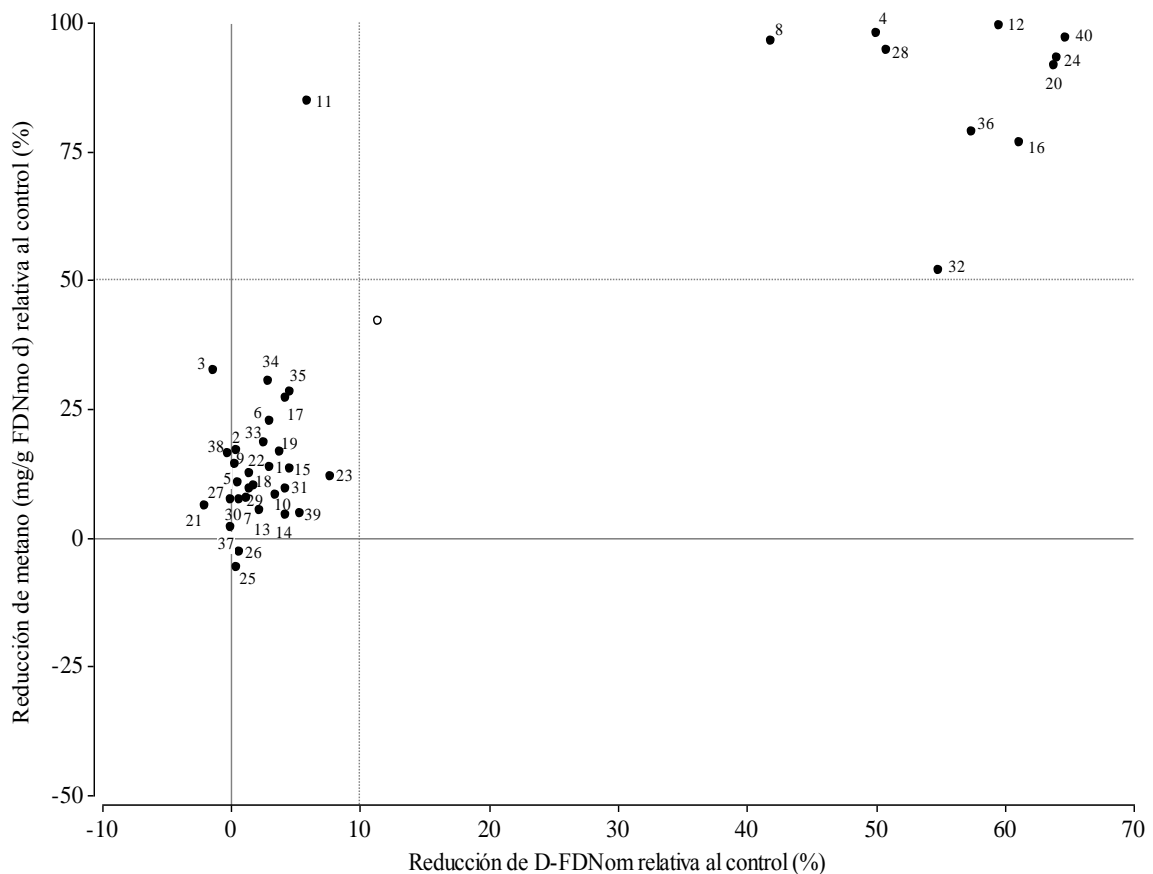


Fig. 2.1. Reducción relativa al control de la producción de metano (mg/g FDNmo d) y de la digestibilidad de la fibra (D-FDNmo, g/g) debido al agregado de aceites esenciales (•) y de monensina (o) en el ensayo 1. Puntos: 1-4. *Aloysia gratissima* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 5-8. *Eucalyptus globulus* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 9-12. *Lippia turbinata* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 13-16. *Mentha x piperita* var. *vulgaris* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 17-20. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* ec. *compacto* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 21-24. *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. *mendocino* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 25-28. *Rosmarinus officinalis* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 29-32. *Schinus molle* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 33-36. *Tagetes minuta* (1, 10, 100 y 1000 mg/l); 37-40. *Thymus vulgaris* (1, 10, 100 y 1000 mg/l).

### Ajuste de rango de dosis

El efecto de los AE sobre la producción de gas total, de metano y sobre la digestibilidad de la fibra correspondiente al segundo ensayo se presenta en la Tabla 2.5. Nuevamente se encontró una respuesta dosis-dependiente para todas las variables en estudio. En este segundo ensayo, la monensina redujo la producción de gas total (25%) y de metano (44 y 36%, expresado por g MO y de g FDN d respectivamente) comparado al

control, y en este caso la reducción en la digestibilidad de la fibra fue del 15%. Las dosis más altas de cada AE redujeron la digestibilidad de la fibra, excepto en *E. globulus* y *L. turbinata*.

Todos los niveles de *L. turbinata* y bajas dosis (100 mg/l) de *R. officinalis* redujeron la producción de gas (25 a 35%) con una mayor inhibición de la producción de metano (63 a 92%) en comparación al control, y sin efecto sobre la digestibilidad de la fibra. Con dosis similares de *M. x piperita* var. *vulgaris* (200 mg/l) y *T. minuta* (250 mg/l) se observó una reducción de la producción de metano de alrededor del 85%, pero estuvo acompañada de un 15% de reducción de la digestibilidad. Mientras que a mayor dosis de ambos AE, la reducción de la fibra superó el 25%. Lo mismo se observó con la mayor dosis de *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. compacto (250 mg/l), e intermedias a altas (300, 500 y 700 mg/l) de *R. officinalis*, en las que la reducción de la producción de metano superó el 80%, junto con una reducción de la digestibilidad de la fibra de alrededor del 30%.

Opuesto fue el caso de las dosis intermedias a altas de *A. gratissima* (300 mg/l), *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. mendocino (250 y 300 mg/l), *S. molle* (300 y 600 mg/l) y *T. vulgaris* (300 mg/l), que a pesar de que redujeron la digestibilidad de la fibra entre un 15 y 30%, no afectaron la producción de metano en comparación al control. Ambos ecotipos de *O. vulgare* ssp. *hirtum* en elevadas dosis redujeron la producción de gas y la digestibilidad, siendo el efecto del ecotipo compacto de mayor magnitud que en el caso de mendocino.

Reducciones relativas al control en la producción de metano en relación a reducciones en la digestibilidad de la fibra se presentan en la Figura 2.2. Casi un tercio de los aditivos evaluados en el segundo ensayo redujeron la producción de metano más de un 50%, y en la mayoría de los casos (8 de 13 puntos) esta reducción estuvo asociada con más de un 10% de reducción de la digestión de la fibra.

Tabla 2.5. Producción de gas total, de metano y digestibilidad de la fibra con un rango de dosis específico para cada aceite esencial (ensayo 2).

Tratamientos	Dosis mg/l	Gas total		Metano				D-FDNmo <sup>2</sup>	
		ml/g MO		mg/g MO		mg/g FDNmo d <sup>1</sup>		g/g	
Control		292	ab	24,6	abc	114,7	abcde	0,477	abc
Monensina	1,87	220	fghi	13,8	def	73,8	efghi	0,406	efgh
<i>Aloysia gratissima</i>	50	303	a	20,4	bcd	96,6	bcde	0,481	a
	100	297	a	26,0	abc	126,0	abcde	0,472	abc
	150	301	a	25,7	abc	129,0	abcd	0,435	abcdef
	300	276	abc	20,2	bcd	113,0	abcde	0,408	defgh
<i>Eucalyptus globulus</i>	5	291	ab	18,6	bcde	135,4	abc	0,462	abcd
	50	295	a	24,4	abc	111,2	abcde	0,461	abcd
	150	296	a	27,5	ab	91,1	cdefg	0,461	abcd
	300	295	a	22,7	abcd	122,2	abcde	0,469	abcd
<i>Lippia turbinata</i>	30	225	fgh	9,0	efg	45,7	fghij	0,446	abcdef
	60	207	ghij	2,3	g	12,6	j	0,447	abcdef
	120	202	hij	2,0	g	9,5	j	0,455	abcdef
	240	190	ij	4,3	fg	20,0	ij	0,446	abcdef
<i>Mentha x piperita</i> <i>var. vulgaris</i>	50	253	cde	16,9	cde	79,2	defgh	0,459	abcde
	100	243	def	18,5	bcde	94,4	bcdef	0,440	abcdef
	200	194	ij	3,4	fg	17,0	j	0,396	fgh
	400	178	j	2,2	g	12,2	j	0,346	hi
<i>Origanum vulgare</i> <i>ssp. hirtum</i> (Compacto)	0,5	295	a	25,8	abc	129,0	abcde	0,455	abcdef
	5	290	ab	21,7	abcd	99,6	abcde	0,480	ab
	50	300	a	24,5	abc	120,2	abcde	0,461	abcd
	250	198	hij	4,5	fg	37,0	ghij	0,330	i
<i>O. vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i> (Mendocino)	50	293	a	26,0	abc	125,0	abcde	0,462	abcd
	150	300	a	26,8	abc	130,6	abcd	0,428	bcdef
	250	283	ab	25,5	abc	146,7	ab	0,398	fgh
	350	261	bcd	22,5	abcd	127,2	abcde	0,396	fgh
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	220	fghi	6,0	fg	30,0	hij	0,460	abcde
	300	190	j	1,9	g	12,9	k	0,347	hi
	500	189	j	1,2	g	7,9	k	0,367	ghi
	700	184	j	2,1	g	12,3	k	0,317	i

Tabla 2.5. Producción de gas total, de metano y digestibilidad de la fibra con un rango de dosis específico para cada aceite esencial (ensayo 2). **Continuación.**

Tratamientos	Dosis mg/l	Gas total		Metano			D-FDNmo <sup>1</sup>		
		ml/g MO		mg/g MO	mg/g FDNmo d <sup>2</sup>	g/g			
<i>Schinus molle</i>	75	305	a	24,1	abcd	111,8	abcde	0,474	abc
	150	308	a	30,9	abcd	154,8	a	0,448	abcdef
	300	301	a	25,2	abc	136,2	abc	0,414	defg
	600	226	efgh	21,0	abcd	121,4	abcde	0,348	hi
<i>Tagetes minuta</i>	5	295	a	24,3	abc	113,4	abcde	0,468	abcd
	50	262	bcd	19,0	bcd	93,4	cdef	0,462	abcd
	125	200	hij	1,9	g	13,4	j	0,347	hi
	250	189	j	3,0	g	16,0	j	0,402	efgh
<i>Thymus vulgaris</i>	5	289	ab	23,1	abcd	115,4	abcde	0,461	abcd
	50	303	a	28,3	ab	139,1	abc	0,457	abcde
	150	287	ab	23,9	abcd	124,9	abcde	0,427	cdef
	300	237	defg	17,9	bcde	107,9	abcde	0,352	hi
Error estándar		14,8		4,30		21,71		0,0190	
<i>P</i> -valor		< 0,001		< 0,001		< 0,001		< 0,001	

Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre medias (LSD Fisher;  $P < 0,05$ ).  
<sup>1</sup>FDNmo d: fibra en detergente neutro libre de cenizas digerida; <sup>2</sup>D-FDNmo: Digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro libre de cenizas.

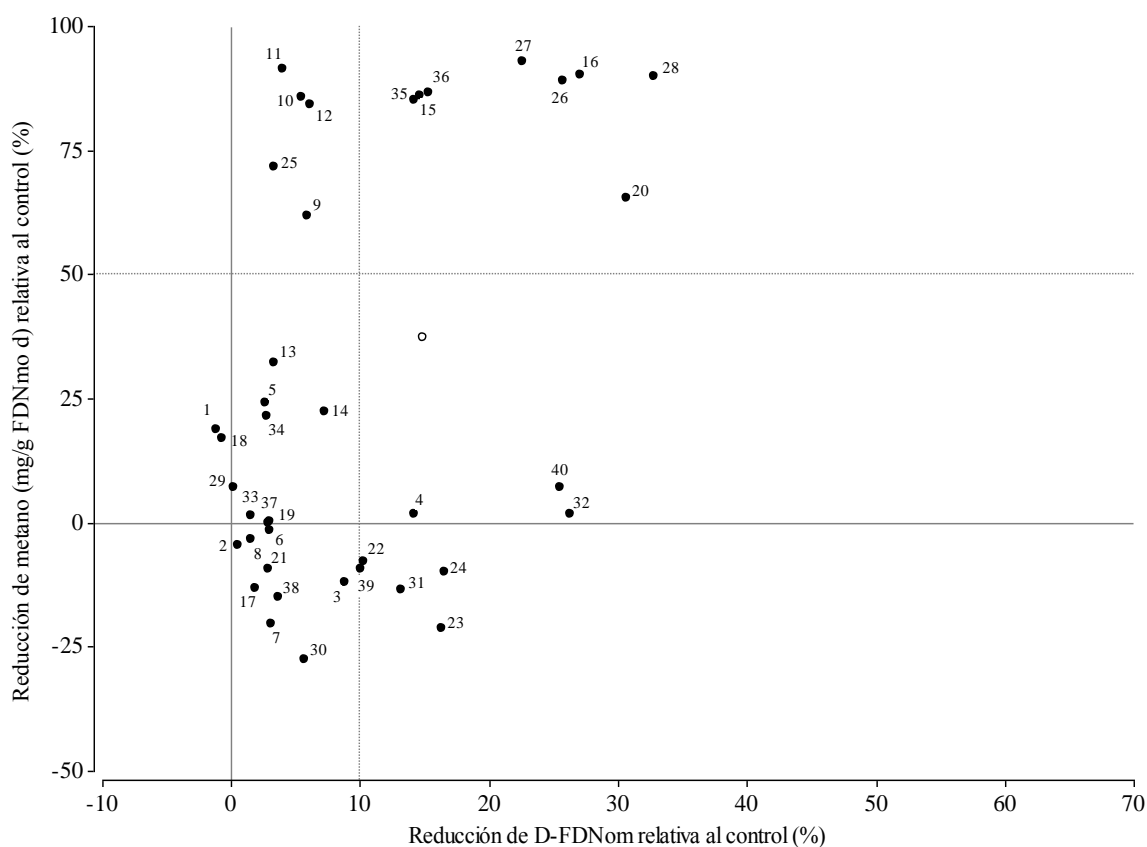


Fig. 2.2. Reducción relativa al control de la producción de metano (mg/g FDNmo d) y de la digestibilidad de la fibra (D-FDNmo, g/g) debido al agregado de aceites esenciales (•) y de monensina (o) en el ensayo 2. Puntos: 1-4. *Aloysia gratissima* (50, 100, 150 y 300 mg/l); 5-8. *Eucalyptus globulus* (5, 50, 150 y 300 mg/l); 9-12. *Lippia turbinata* (30, 60, 120 y 240 mg/l); 13-16. *Mentha x piperita* var. *vulgaris* (50, 100, 200 y 400 mg/l); 17-20. *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* ec. *compacto* (0,5, 5, 50 y 250 mg/l); 21-24. *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. *mendocino* (50, 150, 250 y 350 mg/l); 25-28. *Rosmarinus officinalis* (100, 300, 500 y 700 mg/l); 29-32. *Schinus molle* (75, 150, 300 y 600 mg/l); 33-36. *Tagetes minuta* (5, 50, 125 y 250 mg/l); 37-40. *Thymus vulgaris* (5, 50, 150 y 300 mg/l).



## DISCUSIÓN

A través de la técnica de producción de gas *in vitro*, que permite la evaluación simultánea de varios tratamientos, se evaluaron diez AE en dosis crecientes con el fin de identificar las combinaciones de AE y dosis más eficaces para reducir la producción de metano. Además, se determinó la composición química de los AE con el fin de relacionar el perfil químico con los efectos observados. El objetivo de este trabajo fue evaluar una serie de AE para seleccionar aquellos con efectos positivos sobre la fermentación ruminal *in vitro* para mayor estudio posterior. La monensina fue seleccionada como control positivo debido a que se ha reportado que tiene capacidad antimetanogénica (Van Nevel y Demeyer, 1977). Sin embargo, debido a una menor aceptación del público por el uso de antibióticos con fines nutricionales, resulta necesario identificar alternativas de origen natural que puedan ser más aceptadas.

Los efectos de la monensina sobre los parámetros de fermentación *in vitro* y la reducción en la producción de metano son consistentes con aquellos reportados previamente (Russell y Strobel, 1989; Castillejos *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2008). Russell y Strobel (1989) reportaron una asociación de la reducción de la producción de metano con una disminución de la producción de acetato causada por una reducción de la digestión de la fibra en detergente neutro, lo cual coincide con lo observado en ambos ensayos. La molécula de este ionóforo está compuesta por más de 36 carbonos, en complejas interacciones con distintos cationes (Łowicki y Huczyński, 2013). Las bacterias Gram negativas tienen una membrana de protección externa a través de la cual sólo pueden pasar pequeños compuestos hidrofílicos por medio de canales de proteínas, mientras que sirve de barrera para la penetración de macromoléculas. Esta sería la razón por la que las bacterias Gram negativas son relativamente más resistentes a estos antibióticos con estructuras macromoleculares (Helander *et al.*, 1998). En contraposición, la mayoría de los compuestos de los AE poseen sólo entre 10 y 15 carbonos, lo que favorece su penetración gracias a su bajo peso molecular y a su propiedad lipofílica (Helander *et al.*, 1998).

Como se esperaba, la respuesta generada por los AE sobre las variables estudiadas en ambos ensayos dependió del tipo de AE (especie vegetal) y de la dosis empleada. Dorman y Deans (2000) concluyeron que la potencia antimicrobiana del AE varía considerablemente dependiendo de la composición química (componentes presentes y sus proporciones), de las interacciones entre los componentes de los AE y de las configuraciones químicas de los componentes. En el presente trabajo, los AE de las plantas evaluadas presentaron diferentes perfiles químicos, lo que explica la diferencia en el efecto generado por cada AE. En relación a la dosis, en ambos ensayos se observó una respuesta dosis-dependiente, como ha sido previamente reportado (Macheboeuf *et al.*, 2008; Klevenhusen *et al.*, 2012; Khiaosa-Ard y Zebeli, 2013).

Para seleccionar una combinación de AE y dosis efectiva se debe considerar que el efecto buscado es inhibir la metanogénesis sin disminuir la digestión del sustrato, lo que implicaría un perjuicio nutricional para el animal ya que reducirá el aprovechamiento que pueda hacer de la dieta. En función de esto, se puede separar las combinaciones de AE y dosis evaluadas en aquellas que generaron un efecto positivo: reducción de la producción de metano sin afectar la digestibilidad de la fibra; de aquellas que generaron efectos indeseables: inhibición de la metanogénesis con disminución de la digestibilidad de la fibra; o negativos: reducción de la digestibilidad de la fibra sin efectos sobre la producción de metano.

Si se comparan las Figuras 2.1 y 2.2 se observa que en el segundo ensayo, en el que el rango de dosis fue más acotado y específico para cada AE, el contraste entre el efecto de dosis bajas y altas no fue tan marcado, como se observó en el primer ensayo en el que todas las dosis más elevadas (1000 mg/l) se agruparon. Resultados similares reportaron Kouazounde *et al.* (2015), que en todos los AE que evaluaron redujeron la producción de gas y la digestibilidad en dosis entre 600 y 1200 mg/l, por lo que se concluye que las dosis de AE alrededor de 1000 mg/l causan efectos negativos, y no serían viables para modular la actividad microbiana ruminal.

El AE de *L. turbinata* es el único con el que se obtuvo efectos positivos en todos los niveles evaluados (a excepción de la dosis de 1000 mg/l). Su composición química se caracterizó por una alta proporción de compuestos no oxigenados (71%), los cuales son considerados de menor actividad biológica que los compuestos oxigenados (Chalchat *et al.*, 1997; Cosentino *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000). Esta puede ser la razón por la que sus efectos no fueron negativos en el rango de dosis evaluadas en comparación al efecto causado por los otros AE. Respecto a los componentes que se detectaron en este AE, Castillejos *et al.* (2006) reportaron efectos tóxicos de limoneno a niveles de 50 y 500 mg/l, y concluyeron que pareciera no haber beneficio en usar limoneno como aditivo para modificar la fermentación microbiana ruminal. Por el contrario, en el presente estudio, entre todos los AE evaluados, *L. turbinata* fue el más efectivo a todos los niveles de inclusión, reduciendo el metano a la mitad respecto del control y con reducción relativa a la monensina de entre un 35 y 85%, sin afectar la digestibilidad de la fibra.

El otro AE que mostró efectos positivos fue el de *T. minuta*, pero sólo en niveles bajos a intermedios (10 y 100 mg/l). Este AE se caracterizó por una alta proporción de cetonas (81%), representado por la presencia de verbenona, piperitenona y los isómeros *cis* y *trans* de tagetona. Una particularidad de este AE es que la composición química es muy distintiva de este grupo de plantas, ya que algunos componentes sólo existen dentro del género *Tagetes*, como por ejemplo la tagetona (Chamorro *et al.*, 2008). Un aspecto que se observa en común en los AE de *L. turbinata* y de *T. minuta*, en comparación con el resto de los AE evaluados, es la presencia simultánea de grupos epóxidos y cetonas entre los que podría existir alguna interacción. Un grupo epóxido es un éter cíclico compuesto por un anillo de tres átomos que se aproxima a un triángulo equilátero, lo que provoca que la molécula esté torsionada y por lo tanto sea altamente reactiva, inclusive más que otros éteres (Dewick, 2002). Por su parte, las cetonas han sido señaladas como el grupo químico responsable de la bioactividad de los AE del género *Tagetes* (Héthélyi *et al.*, 1986).

Los efectos de los AE de las otras dos plantas nativas evaluadas fueron similares. Bajos niveles de *A. gratissima* y *S. molle* no tuvieron efecto sobre las variables analizadas, mientras que a altos niveles de inclusión (desde 300 mg/l), se observó una marcada

reducción de la digestibilidad de la fibra sin efectos sobre la producción de metano. A pesar de que la respuesta fue similar, la composición química de ambos AE difirió, excepto por el hecho de que en ambos AE se detectó la mayor proporción de sesquiterpenos. El AE de *A. gratissima* se caracterizó por una presencia relativamente similar de alcoholes e hidrocarburos. Mientras que el AE de *S. molle* fue el segundo en el que se observó mayor predominancia de hidrocarburos, luego de *L. turbinata*, pero a diferencia de este, hubo menor diversidad de grupos funcionales en el resto de los componentes detectados (39% alcoholes y 2% éter-fenólicos). Por lo que no se pudo determinar un patrón que relacione el perfil de la composición química con la ausencia de efecto en los microorganismos ruminales. A las dosis evaluadas en el presente estudio, estos AE no representaron una alternativa promisorio para inhibir la producción de metano *in vitro*.

La respuesta obtenida con la adición del AE de *R. officinalis* fue positiva con la menor dosis del segundo ensayo (100 mg/l), mientras que con dosis superiores a 300 mg/l la disminución de la producción de metano estuvo asociada a una disminución en la digestibilidad de la fibra, efecto indeseable para la nutrición del hospedero. Este AE demostró tener una elevada actividad antimicrobiana, con un estrecho rango de dosis entre aquellas en la que se obtiene efectos deseables (inhibición de la producción de metano) y aquellas con efectos negativos (reducción de la digestión de la fibra), lo que dificulta determinar un nivel de inclusión óptimo. Estos resultados no concuerdan con los hallazgos de Castillejos *et al.* (2008) y de Pinski *et al.* (2015), quienes reportaron que no hubo reducción de los productos de fermentación (amoníaco y AGV) o de la producción de metano con niveles de 500 mg/l.

Un patrón similar a lo que se observó con el AE de romero se detectó con niveles intermedios a altos (desde 200 mg/l) de *M. x piperita*, donde la disminución de la producción de metano también estuvo asociada a una reducción de la digestibilidad de la fibra. Pero a diferencia del anterior, en el AE de menta no se observaron efectos sobre la fermentación con dosis bajas. Este AE presentó la mayor proporción de alcoholes entre los compuestos evaluados, los cuales se caracterizan por tener actividad bactericida más que

bacteriostática sobre los microorganismos (Dorman y Deans, 2000), lo que da cuenta de su potente actividad antimicrobiana. El efecto adverso causado por este AE sobre las poblaciones microbianas ruminales, y en particular sobre las bacterias celulolíticas (Patra y Yu, 2012, 2015; Cobellis *et al.*, 2016a), puede explicar la reducción de la digestibilidad de la fibra observada para niveles superiores a 200 mg/l.

La reducción de la digestibilidad de la fibra encontrada para ambos ecotipos de *O. vulgare* ssp. *hirtum* a elevadas dosis de inclusión concuerdan con los reportes previos (Cardozo *et al.*, 2005; Busquet *et al.*, 2006; Castillejos *et al.*, 2008). Busquet *et al.* (2006) evaluaron diferentes AE y sus componentes principales y concluyeron que el carvacrol es el principal compuesto activo en el AE de orégano. En el presente estudio, carvacrol y su forma metilada (carvacrol metil éter) se encontraron en bajas proporciones; siendo *trans* hidro sabineno, timol y  $\gamma$  terpineno los principales componentes detectados para estos AE, lo que puede explicar la falta de efecto en dosis similares a las evaluadas por Busquet *et al.* (2006) (300 mg/l). A pesar de que la composición del AE de ambos ecotipos fue similar, a un mismo nivel de inclusión (250 mg/l) la reducción de las tres variables en estudio fue mayor en el ecotipo compacto que en el mendocino, probablemente debido a la mayor proporción de timol y de carvacrol metil éter en el primero (Dorman y Deans, 2000).

Sólo niveles elevados de *T. vulgaris* afectaron la producción de gas y la digestión de la fibra; sin embargo, estos efectos no estuvieron acompañados por una reducción en la producción de metano. La propiedad antimicrobiana de los AE de tomillo está correlacionada con su alto contenido de fenoles (Cosentino *et al.*, 1999), representada por el timol, uno de sus componentes principales. El timol es un compuesto de alta propiedad disruptiva sobre la integridad de la membrana celular (Helander *et al.*, 1998; Evans y Martin, 2000), lo que le confiere a este AE un gran poder antimicrobiano. En una evaluación con dosis crecientes de este AE (5, 50 y 500 mg/l), Castillejos *et al.* (2008) encontraron un aumento en los AGV totales en todas las dosis, mientras que al incorporar solo su componente principal (timol a 500 mg/l) la concentración total de AGV se redujo alrededor de un 60% (Castillejos *et al.*, 2006). Estos resultados indican que la acción de los AE, que son mezclas complejas de componentes con distintas estructuras químicas,

puede no ser explicada por el comportamiento del componente que se encuentre en mayor proporción.

Los AE de orégano y tomillo presentaron la mayor proporción de compuestos fenólicos, los cuales son descriptos como los compuestos de mayor bioactividad. Esto se debe a la capacidad de estas sustancias de disturbar la membrana de los microorganismos (Helander *et al.*, 1998). En un estudio en el que se evaluaron más de 30 componentes de AE, Dorman y Deans (2000) señalaron que el timol fue el componente con mayor espectro de acción, seguido por el carvacrol. A pesar de que son considerados de alta actividad antimicrobiana, tienen baja especificidad (Dorman y Deans, 2000). En el presente trabajo, su elevada capacidad antimicrobiana se tradujo en una importante inhibición de la producción de gas total y/o de metano, y de la digestibilidad del sustrato con dosis mayores a 200 mg/l, lo que indica que la actividad microbiana fue severamente afectada. Mientras que en bajas dosis (1 a 100 mg/l) no se modificó la actividad microbiana.

Contrario a lo descrito previamente, el AE de *E. globulus* solo generó un efecto con la dosis de 1000 mg/l evaluada en el primer ensayo. Mientras que en el segundo ensayo, al rango de dosis evaluadas para este AE, no se encontraron efectos en ninguna de las variables en estudio. La ausencia de efectos sugiere una baja actividad antimicrobiana de este AE, siendo necesarias dosis más elevadas para modular la actividad microbiana ruminal. En este sentido, Patra y Yu (2012) observaron una reducción lineal en la producción de gas y metano con niveles en el rango de 250 a 1000 mg/l. Esto explicaría la falta de efecto en el segundo ensayo. Para este AE la dosis efectiva para modular la fermentación ruminal *in vitro* probablemente se encuentre entre 300 y 1000 mg/l, lo cual no fue evaluado en el presente trabajo.

Existe discordancia en la capacidad de los AE para modular la actividad microbiana en el rumen. La diversidad de componentes que pueden estar presentes, y su proporción, pueden explicar las diferencias en la bioactividad de los distintos AE. Además, debido a las diferencias en la composición química existentes entre ellos resulta difícil

determinar las dosis óptimas en las que serán efectivos para modular la actividad microbiana, especialmente en etapas exploratorias en las que no se cuenta con información previa de su bioactividad con microorganismos ruminales (Jouany y Morgavi, 2007). En el presente trabajo se observó que cuando la proporción de compuestos de gran actividad antimicrobiana fue alta (por ejemplo, gran proporción de fenoles), dosis superiores a los 200 mg/l de medio de incubación afectaron en gran magnitud el aprovechamiento del sustrato, mientras que para aquellos AE con compuestos de menor bioactividad, como *L. turbinata*, fue factible alcanzar dosis superiores sin afectar la digestibilidad del sustrato. Por lo tanto, la caracterización química de los AE resulta un aspecto crítico en las evaluaciones con AE, ya que provee elementos para poder explicar los efectos observados y comparar resultados entre distintos estudios (Hili *et al.*, 1997), así como tener una noción *a priori* del rango de dosis en el que potencialmente serán efectivos.

Por último, los resultados soportan la hipótesis de que los AE tienen el potencial de modificar selectivamente la actividad microbiana ruminal para disminuir la producción de metano. Los AE obtenidos de plantas nativas de Argentina han demostrado capacidad de modificar diversos procesos biológicos, actuando como agentes biocidas (Tereschuk *et al.*, 1997; García *et al.*, 2003; Fuselli *et al.*, 2006); sin embargo, para el conocimiento de la autora, no han sido previamente evaluados para modificar la función microbiana ruminal. Estas nuevas fuentes de AE probaron tener capacidad para modular la actividad microbiana ruminal. En ambos ensayos se destacó la acción del AE obtenido de *L. turbinata*, con el que se obtuvo una importante reducción en la producción de metano (entre 60 y 90%), aun a bajas dosis (30 y 60 mg/l) sin efectos sobre la digestión de la fibra. Por otro lado, se destacó el AE de *T. minuta* que a dosis intermedias (10 y 100 mg/l) redujo la producción de metano, sin afectar la digestibilidad de la fibra.

## CONCLUSIONES

Los aceites esenciales obtenidos de diferentes especies vegetales afectan el proceso de fermentación (producción de gas), la producción de metano y la digestibilidad de la fibra al ser incorporados en sistemas de fermentación *in vitro* con poblaciones microbianas ruminales.

La dosis óptima con la que se logra reducir la producción de metano con mínimos efectos sobre el aprovechamiento del sustrato en fermentaciones con licor ruminal *in vitro*, depende de la composición química del aceite esencial. A mayor proporción de compuestos de gran actividad antimicrobiana, la dosis óptima es cercana o inferior a los 200 mg/l de medio de incubación, mientras que para aquellos AE con compuestos de menor bioactividad la dosis puede ser superior.

Los aceites esenciales de plantas nativas de Argentina tienen la capacidad para modificar la fermentación ruminal *in vitro*, y algunos de ellos demostraron potencial para reducir la producción de metano entérico sin afectar la digestibilidad, entre los cuales se destacaron los aceites esenciales de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta*.

Considerando la complejidad de la composición química de los aceites esenciales y su bioactividad resultante, la descripción de la composición química debería ser incluida en estos tipos de evaluaciones.



# EFFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *LIPPIA TURBINATA* Y *TAGETES MINUTA* SEGÚN EL SUSTRATO INCUBADO

## INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se evaluaron diez AE con el objetivo de identificar AE de plantas nativas de Argentina que tengan la capacidad de disminuir la producción de metano y que potencialmente puedan convertirse en nuevos aditivos con capacidad para modular la actividad microbiana ruminal. De este trabajo, se seleccionaron los AE de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* para profundizar con su estudio, ya que se destacaron por reducir la producción de metano con efectos nulos o mínimos sobre la digestibilidad del sustrato.

El género *Lippia* está compuesto por arbustos aromáticos que acumulan gran cantidad de AE (Juliani *et al.*, 2004). Las especies de este género se encuentran principalmente en Centro y Sur América, y en África Tropical (Terblanché y Kornelius, 1996). El AE de *L. turbinata* ha demostrado actividad bactericida, fungicida y virucida (Dellacasa *et al.*, 2003; García *et al.*, 2003; Pérez-Zamora *et al.*, 2016). Además, este AE se ha propuesto como preservante y antioxidante en la industria alimenticia y cosmética (Quiroga *et al.*, 2012; Barbieri *et al.*, 2016).

*Tagetes minuta* también es una planta aromática de Sur América, distribuida en la región centro-norte de Argentina, donde crece naturalmente desde primavera y prácticamente desaparece en el inicio del invierno, momento en que concluye su ciclo de vida (Chamorro *et al.*, 2008). Su AE tiene actividad biocida, actuando contra bacterias, hongos e insectos (Senatore *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2012; Camiletti *et al.*, 2016). La composición química de su AE es una característica distintiva de este grupo de plantas, ya que algunos componentes solo se han descrito en este género como por ejemplo la tagetona (Chamorro *et al.*, 2008).

En la etapa exploratoria se utilizó un sustrato estándar para determinaciones de laboratorio (80:20 heno de alfalfa: grano de maíz). Sin embargo, se ha reportado que la bioactividad de los AE depende, entre otros factores, del sustrato de fermentación (Bodas *et al.*, 2012; Klevenhusen *et al.*, 2012). Existen pocos estudios en los que se evalúen los efectos de la adición de los AE en la fermentación de distintos sustratos en un mismo experimento (Molero *et al.*, 2004; Castillejos, 2005; Mateos *et al.*, 2013), por lo que la interacción entre el sustrato y el aditivo ha sido poco explorada.

El objetivo de este capítulo fue evaluar el efecto de la adición de dosis crecientes de AE de *L. turbinata* y *T. minuta* sobre la fermentación ruminal *in vitro* de sustratos representativos de dietas de diferentes sistemas de producción ganadera y de un sustrato estándar de determinaciones de laboratorio.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Diseño experimental

Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar el efecto de dosis crecientes de AE de *L. turbinata* y *T. minuta* en la producción de metano durante la fermentación de diferentes sustratos. Se realizaron dos ensayos independientes con la misma metodología para evaluar cada uno de los dos AE. Se evaluaron cinco sustratos, de los cuales cuatro simulaban dietas típicas de sistemas de producción bovina: cría, recría, engorde y tambo, mientras que el restante corresponde al sustrato estándar de determinaciones de laboratorio evaluado previamente. Las dosis de AE fueron: 0, 0,3, 3, 30 y 300 µl/l. Para cada sustrato, se incluyó como control positivo un tratamiento con monensina (Option 20%, Brascorp S.A., Buenos Aires, Argentina) a 1,87 mg de monensina pura/l, según lo sugerido por Araujo *et al.* (2011).

Se utilizó un diseño de parcelas divididas, en el que el factor principal de aleatorización fue el tipo de sustrato; y el factor secundario fue la dosis del AE y la monensina (control positivo). Se realizaron tres incubaciones en semanas consecutivas, consideradas como bloques (repeticiones). Dentro de cada bloque, se utilizaron además tres frascos para cada tratamiento que se utilizaron con distintos fines que se detallan a continuación en la descripción metodológica.

## Aceites esenciales

Se utilizaron los mismos AE de *L. turbinata* y *T. minuta* que se evaluaron en el Capítulo II. Brevemente, las plantas se recolectaron en Characato, Córdoba (31°28'77" S, 64°12'32" O); el AE se extrajo por hidrodestilación de la parte aérea de las plantas en plena floración y la composición química se determinó por CG-EM. Se utilizó un equipo Perkin Elmer Clarus 600 (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), equipado con una columna polar, Supelcowax 10 (30 m x 0,25 µm) y luego una columna apolar, DB-5 (30 m x 0,25 µm), con helio como gas portador. Las condiciones para ambas

columnas fue: temperatura inicial de 60°C por tres minutos, rampa de 4°C/min, hasta los 240°C y temperatura del inyector 250°C. La identificación de los compuestos se realizó utilizando la base de datos NIST (versión 3.0), la base de datos de espectros de masas disponibles en la FCA – UNC y otros disponibles en la bibliografía (Adams, 1995). La proporción de cada componente se calculó dividiendo el área de su pico respecto de la sumatoria del área de todos los compuestos detectados.

## **Sustratos**

Los sustratos se prepararon con los componentes previamente liofilizados y molidos (malla: 2 mm). Las proporciones de los componentes y la composición química de cada sustrato se detallan en la Tabla 3.1. El análisis químico de los sustratos se realizó con la metodología descrita en el Capítulo II. Brevemente, el contenido de MO se determinó por incineración en mufla a 550°C durante 6 hs; la PB a través del método de Kjeldahl (AOCS: 954.01, 1998); los análisis de aFDN y FDA se realizaron según Goering y Van Soest (1970); y la DMS<sub>iv</sub> se realizó según Tilley y Terry (1963).

## **Incubación *in vitro***

Se utilizó la misma metodología que la descrita en el Capítulo II. Brevemente, el FR se obtuvo de tres novillos Hereford canulados en rumen que recibían una dieta de heno de alfalfa y grano de maíz (80:20 en base MS). El FR de los tres novillos fue mezclado, homogeneizado y filtrado dos veces a través de dos telas de quesería. Todas las etapas hasta la inoculación se realizaron bajo condiciones de anaerobiosis (constante infusión de dióxido de carbono) y con temperatura constante (39°C). El pH inicial del FR en el ensayo de *L. turbinata* fue  $6,54 \pm 0,071$  y en el de *T. minuta* el pH inicial fue  $6,50 \pm 0,110$ . La fermentación se realizó en frascos de 100 ml, con 10 ml de FR, 40 ml de *buffer* fosfato/carbonato y 0,5 g de la mezcla del sustrato correspondiente. Se prepararon soluciones de monensina y de los AE en etanol al 70% a la concentración necesaria para lograr la dosis final en el medio de incubación, y 1 ml de esta solución se inoculó inmediatamente antes de agregar el FR. En los frascos del tratamiento de dosis cero (sin

AE) se agregó una cantidad equivalente de etanol 70%. Se incluyó un blanco (FR y *buffer*, sin sustrato) para luego corregir los datos de producción de gas y de digestibilidad. A intervalos regulares se midió la presión interna de los frascos utilizando un transductor de presión (Sper Scientific Ltd., Scottsdale, Arizona, Estados Unidos). Luego de cada lectura, los frascos se agitaron manualmente. Al final de la incubación (48 hs) los frascos se colocaron en agua helada para detener la fermentación. Una de los frascos se utilizó para medir el pH al final de la incubación y los otros dos se conservaron a -20°C hasta posterior determinación de digestibilidad.

Tabla 3.1. Proporción de componentes y composición química de los sustratos representantes de dietas de sistema de producción bovina y del sustrato estándar de determinaciones de laboratorio utilizados para la fermentación ruminal *in vitro*.

Caracterización del sustrato	Estándar	Cría	Recría	Engorde	Tambo
<b>Componentes (%)</b>					
Expeller de soja	-	-	15	5	10
Grano de maíz	20	-	-	80	-
Grano de maíz húmedo	-	-	-	-	28
Heno de alfalfa	80	-	15	15	15
Silaje de maíz	-	-	-	-	46
Silaje de sorgo	-	-	70	-	-
<i>Panicum maximum</i>	-	100	-	-	-
Urea	-	-	-	-	1
<b>Composición química (g/kg MS)</b>					
Materia orgánica	913	897	910	968	946
Proteína bruta	178	40	167	124	164
Fibra en detergente neutro	373	770	472	175	265
Fibra en detergente ácido	239	462	281	71	142
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS	739	554	681	877	821

## **Análisis y determinaciones químicas**

### *a) Determinación de pH*

Una de las tres réplicas de cada bloque se utilizó para determinar el pH del medio

al final de la incubación. Para ello se utilizó un medidor digital portátil de pH Sartorius vidrio combinada PY-P12 con corrección automática de temperatura. Esta determinación se realizó solo en el ensayo de *L. turbinata*.

#### *b) Producción de gas y metano*

La presión interna de los frascos se midió a las 3, 5, 7, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 hs de iniciada la fermentación. El volumen de gas producido a cada horario se estimó con la regresión lineal de presión por volumen ( $\text{Volumen}_{(\text{ml})} = 4,905 \times \text{Presión}_{(\text{psi})} + 0,543$ ) descrita en el Capítulo II, el cual fue corregido con el volumen de gas producido por el blanco. La producción de gas acumulado se calculó como la suma de los volúmenes corregidos a cada horario de lectura. El volumen de gas acumulado por frasco se corrigió por g de MO incubada.

La producción de metano se calculó a partir de la producción de gas acumulada al final de la incubación y la concentración de metano. Para ello, se recolectó la totalidad del gas producido en viales de 250 ml herméticamente cerrados. La frecuencia de toma de muestras de gas dependió de la tasa de fermentación, procurando evitar que la presión interna llegue a 7,0 psi, como ha sido sugerido por Theodorou *et al.* (1994). La concentración se determinó por CG utilizando un equipo Hewlett Packard 4890 (HP Inc., Palo Alto, California, Estados Unidos) equipado con una columna analítica Porapak N 80/100 (2 m) y con nitrógeno como gas portador. La temperatura del inyector fue de 110°C, la del horno fue de 90°C y la temperatura del detector de ionización de llama fue de 250°C.

#### *c) Digestibilidad del sustrato*

Otra de las réplicas se utilizó para determinar la digestibilidad de la MO (DMO) y la tercer réplica para determinar la D-FDNmo. La DMO se obtuvo filtrando los residuos en crisoles de peso conocido (DURAN® 25-851-32 DURAN Produktions GmbH & Co.; Hattenbergstr, Mainz, Alemania). Los residuos secos se pesaron luego de 24 hs a 105°C, y se determinó el contenido de cenizas por incineración a 550°C por 4 hs. La cantidad

desustrato digerido se calculó por diferencia entre los g de MO incubada menos los g de MO del residuo (luego de la corrección con el residuo del blanco). La fórmula utilizada para el cálculo de la DMO fue: g MO digeridos / g MO incubados.

La D-FDNmo se obtuvo de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991); brevemente, el contenido de los frascos se transfirió a tubos de 200 ml, donde se agregaron 100 ml de solución de detergente neutro junto con  $\alpha$ -amilasa termoestable. Luego de una hora de ebullición, los residuos se filtraron en crisoles de peso conocido (DURAN® 25-851-32 DURAN Produktions GmbH & Co.; Hattenbergstr, Mainz, Alemania) y se secaron en horno a 105°C por 24 hs. Luego de pesar los residuos secos, se determinó el contenido de cenizas por incineración a 550°C por 4 hs. Se realizó el mismo procedimiento con cada sustrato para determinar la cantidad de FDNmo incubada, y por diferencia con los g de FDNmo de los residuos (luego de la corrección con el residuo del blanco) se calcularon los g de FDNmo d. La fórmula utilizada para el cálculo de la D-FDNmo fue: g FDNmo d/ g FDNmo incubada.

### **Análisis estadístico**

Los datos de ambos ensayos se analizaron independientemente a través de un análisis de varianza con un diseño en parcelas divididas en bloques utilizando el *software* InfoStat (2016). Se consideró como tratamiento a las cinco dosis y el control positivo (monensina); y las incubaciones fueron consideradas como bloques. Para obtener el valor del bloque en las variables que se contó con el dato de más de un frasco (ej. producción de gas), los valores de las réplicas se promediaron. Los factores que consideró el modelo estadístico fueron los bloques (n = 3), los sustratos (parcela principal; n = 5), el tratamiento (parcela secundaria; n = 5) y su interacción. Para la evaluación de las diferencias de pH entre sustratos (ensayo de *L. turbinata*), se consideraron solo las dosis cero, y el modelo tuvo el efecto fijo del sustrato (n = 5) y el efecto aleatorio del bloque (n = 3). Mientras que para la evaluación de la interacción de dosis por sustrato para la variable de pH se utilizó también el modelo de parcelas divididas recién descripto. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con la prueba de comparación múltiple de medias de Di Rienzo,

Guzman y Casanoves (DGC; Di Rienzo *et al.*, 2002) con  $\alpha = 0,05$ .



# RESULTADOS

## Composición química de los aceites esenciales

La composición química de los AE de *L. turbinata* y *T. minuta* se presenta en la Tabla 3.2. Se identificaron 11 compuestos en *L. turbinata*, de los cuales dos fueron sesquiterpenos (óxido de cariofileno y  $\beta$  cariofileno) y el resto fueron monoterpenos. El principal grupo funcional en este AE fue el de hidrocarburos, con cuatro componentes representando el 71% del total de la composición. Los otros grupos funcionales presentes fueron alcoholes (6%), ceto-alcoholes (3%), cetonas (6%), epóxidos (6%) y ésteres (8%). El mayor componente fue limoneno (62%), seguido por acetato de bornilo (8%) y carvona (6%). Los terpenos oxigenados representaron menos del 30% del total de la composición.

Nueve componentes se identificaron para *T. minuta*, con solo un sesquiterpeno (spatulanol) mientras que el resto fueron monoterpenos. De los cuatro grupos funcionales presentes, las cetonas fueron las más abundantes (81%), seguida por hidrocarburos (11%), alcoholes (6%) y epóxidos (2%). Los principales compuestos detectados fueron verbenona (42%), *cis* tagetona (28%), limoneno (6%) y *trans* tagetona (6%). Los terpenos oxigenados representaron casi el 90% de la composición.

## Efecto de los aceites esenciales sobre la fermentación

El efecto de dosis crecientes del AE de *L. turbinata* sobre la producción de gas total, de metano y sobre la digestibilidad de los distintos sustratos se presenta en la Tabla 3.3. La interacción sustrato por dosis fue significativa para todas las variables en estudio; y dentro de cada sustrato la respuesta fue dosis-dependiente. A baja dosis (0,3 y 3  $\mu$ l/l) no se detectaron diferencias sobre las variables en estudio y los mayores valores de producción de gas, de metano y digestibilidad se observaron para las dietas representativas de sistemas de engorde y tambo, mientras que los menores para el sustrato de cría. Con la dosis intermedia (30  $\mu$ l/l) se redujo la producción de gas y de metano, sin afectar la digestibilidad de los sustratos, a excepción de una moderada disminución de la

Tabla 3.2. Composición química de los aceites esenciales de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* utilizados.

Componente	Fórmula química	Porcentaje de cada componente	
		<i>Lippia turbinata</i>	<i>Tagetes minuta</i>
<b>Alcohol</b>			
<i>cis</i> Carveol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	2,1	-
Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	1,4
Spatulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	-	4,6
$\alpha$ Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	3,8	-
<b>Ceto-alcohol</b>			
Cinerolona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	3,2	-
<b>Cetona</b>			
Carvona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	6,0	-
Piperitenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	4,6
<i>cis</i> Tagetona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	27,9
<i>trans</i> Tagetona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	5,9
Verbenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	42,2
<b>Epóxido</b>			
Óxido de cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	2,7	-
Óxido de pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	2,3
Óxido de piperitenona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	3,2	-
<b>Éster</b>			
Acetato de bornilo	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	8,4	-
<b>Hidrocarburo</b>			
Camfeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3,3	-
$\beta$ Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	3,0	-
Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	62,1	6,0
$\beta$ <i>trans</i> Ocimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	5,1
Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	2,2	-

digestibilidad de la materia orgánica en el sustrato de engorde. Con la mayor dosis de AE (300  $\mu$ l/l), la disminución de la producción de gas y de metano fue notable, pero estuvo asociada a una marcada disminución de la digestibilidad, a excepción del sustrato estándar en el que no se afectó la digestibilidad. El efecto de la monensina fue similar al observado

para la mayor dosis de AE (300  $\mu$ l/l), con la cual también se disminuyó la producción de gas y de metano con una reducción en la digestibilidad en todos los sustratos. Respecto al efecto de los distintos sustratos a una misma dosis, en niveles de adición bajos e intermedios (0,3, 3 y 30  $\mu$ l/l) todas las variables evaluadas fueron mayores en el sustrato de engorde y menor en el de cría. Para la mayor dosis (300  $\mu$ l/l) la producción de gas y la digestibilidad varió entre los sustratos, pero no se observó diferencia en la producción de metano.

El pH al final de la incubación de cada sustrato y el efecto de dosis crecientes del AE de *L. turbinata* sobre esta variable se presenta en la Figura 3.1. El estándar de laboratorio, junto con los sustratos que simulaban dietas de cría y recría presentaron los mayores valores de pH (6,74, 6,73 y 6,75 respectivamente), respecto de los sustratos de engorde y tambo (6,58 y 6,63 respectivamente). La interacción sustrato por dosis fue significativa para el pH, generando diferencias respecto de la dosis cero solo en los tratamientos de monensina y la mayor dosis (300  $\mu$ l/l) de los sustratos de cría y de tambo.

El efecto de dosis crecientes del AE de *T. minuta* sobre la producción de gas total y de metano y sobre la digestibilidad de los distintos sustratos se presenta en la Tabla 3.4. Al igual que para el AE de *L. turbinata*, la interacción sustrato por dosis fue significativa para todas las variables en estudio; y en todos los sustratos la respuesta fue dosis-dependiente. A baja dosis (0,3 y 3  $\mu$ l/l) no se detectaron diferencias sobre las variables en estudio y los mayores valores de producción de gas y de metano y digestibilidad se observaron para las dietas representativas de sistemas de engorde, y los menores para el sustrato de cría. Con la dosis intermedia (30  $\mu$ l/l) se redujo la producción de gas y de metano, sin afectar la digestibilidad en el sustrato estándar y en el de cría. En el sustrato de tambo esta dosis redujo la producción de gas y metano pero estuvo asociado a una disminución de la digestibilidad de la fibra. Con la mayor dosis de AE (300  $\mu$ l/l) no se observó diferencia entre sustratos en la producción de metano, y la respuesta en el resto de las variables y de la monensina fue similar al observado para el AE de *L. turbinata*.

Tabla 3.3. Efecto de dosis crecientes de aceite esencial de *Lippia turbinata* sobre la producción de gas total y de metano, sobre la digestibilidad de la materia orgánica y de la fibra en la fermentación *in vitro* de sustratos representativos de dietas de sistemas de producción ganadera y de un sustrato estándar de laboratorio.

Sustrato	Tratamiento <sup>1</sup>	Gas total ml/g MO	Metano ml/g MO	DMO <sup>2</sup> g/g	D-FDNmo <sup>3</sup> g/g
Estándar	0	289 a B	34,3 a A	0,662 a C	0,485 a C
	0,3	293 a B	35,5 a A	0,684 a C	0,489 a C
	3	290 a B	32,9 a A	0,655 a C	0,492 a C
	30	230 b C	24,8 b A	0,631 a B	0,466 a C
	300	178 c B	3,7 c A	0,624 a A	0,407 a A
	Monensina	223 b B	20,2 b A	0,636 a B	0,452 a A
Cría	0	199 a D	25,2 a C	0,420 a E	0,441 a C
	0,3	190 a D	24,8 a C	0,439 a E	0,443 a C
	3	191 a D	23,4 a C	0,404 a D	0,454 a C
	30	167 b D	16,8 b B	0,398 a E	0,396 a C
	300	49 d D	5,0 c A	0,193 b C	0,149 b D
	Monensina	74 c E	7,3 c C	0,242 b D	0,180 b D
Recría	0	243 a C	29,1 a B	0,581 a D	0,421 a C
	0,3	242 a C	30,7 a B	0,539 a D	0,426 a C
	3	243 a C	30,5 a B	0,569 a D	0,412 a C
	30	182 b D	16,1 b B	0,521 a C	0,427 a C
	300	128 c C	3,9 c A	0,430 b B	0,245 c C
	Monensina	169 b D	15,3 b B	0,519 a C	0,347 b B
Engorde	0	332 a A	37,8 a A	0,891 a A	0,709 a A
	0,3	334 a A	37,6 a A	0,873 a A	0,731 a A
	3	330 a A	33,7 a A	0,864 a A	0,735 a A
	30	269 b A	17,2 b B	0,814 b A	0,713 a A
	300	211 c A	3,3 c A	0,698 c A	0,346 c B
	Monensina	259 b A	17,0 b B	0,813 b A	0,463 b A
Tambo	0	303 a B	34,4 a A	0,811 a B	0,592 a B
	0,3	307 a B	35,5 a A	0,801 a B	0,591 a B
	3	308 a B	36,7 a A	0,806 a B	0,588 a B
	30	250 b B	22,7 b A	0,756 a A	0,610 a B
	300	200 c A	3,4 d A	0,648 b A	0,197 c D
	Monensina	209 c C	14,5 c B	0,709 b B	0,278 b C
Error estándar		5,4	1,60	0,0204	0,0166
P-valor	Sustrato	0,0014	0,1238	0,0002	0,0139
	Tratamiento	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Sust. x Trat.	<0,0001	0,0011	0,0001	<0,0001

Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias entre dosis dentro de un mismo sustrato (DGC,  $P < 0,05$ ). Letras mayúsculas distintas en la misma columna indican diferencias entre sustratos para una misma dosis (DGC,  $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dosis de aceite esencial expresada en  $\mu\text{l/l}$ . <sup>2</sup>DMO: Digestibilidad de la materia orgánica; <sup>3</sup>D-FDNmo: Digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro libre de cenizas.

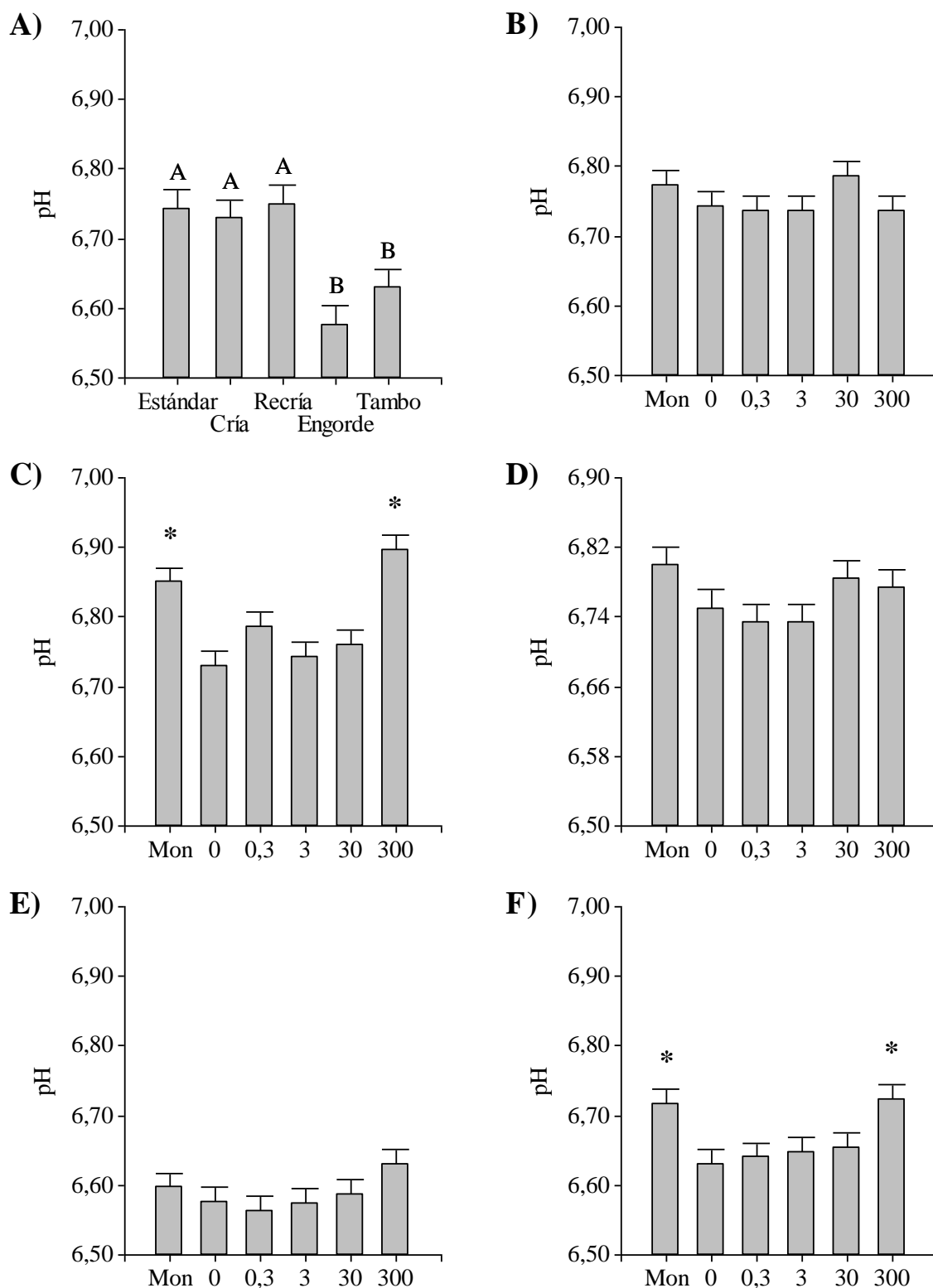


Fig. 3.1. Promedio de pH correspondiente al tratamiento de dosis cero de cada sustrato (A) y efecto del agregado de dosis crecientes de *Lippia turbinata* en los distintos sustratos evaluados: B) estándar; C) cría; D) recría; E) engorde y F) tambo. Las barras representan el error estándar de la media. En A letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (DGC,  $P$ -valor  $< 0,05$ ). En el resto de los gráficos: \* Diferencia estadísticamente significativa en comparación a la dosis cero (DGC;  $P$ -valor  $< 0,05$ ).

Tabla 3.4. Efecto de dosis crecientes del aceite esencial de *Tagetes minuta* sobre la producción de gas total y de metano, sobre la digestibilidad de la materia orgánica y de la fibra en la fermentación *in vitro* de sustratos representativos de dietas de sistemas de producción ganadera y de un sustrato estándar de laboratorio.

Sustrato	Tratamiento <sup>1</sup>	Gas total	Metano	DMO <sup>2</sup>	D-FDNmo <sup>3</sup>
		ml/g MO	ml/g MO	g/g	g/g
Estándar	0	287 a C	33,5 a A	0,681 a C	0,430 a C
	0,3	284 a C	34,4 a A	0,670 a C	0,422 a C
	3	286 a C	34,0 a A	0,670 a C	0,420 a C
	30	244 b B	29,9 b B	0,640 a C	0,414 a B
	300	149 d C	2,2 d A	0,557 c B	0,297 c B
	Monensina	211 c B	18,4 c B	0,633 b B	0,351 b B
Cría	0	193 a E	25,9 a B	0,342 a D	0,365 a D
	0,3	189 a E	23,5 a B	0,370 a D	0,354 a D
	3	195 a E	24,1 a B	0,353 a D	0,366 a D
	30	162 b D	18,2 b C	0,335 a E	0,364 a C
	300	36 c E	2,1 c A	0,128 b A	0,104 b C
	Monensina	59 c D	7,1 c B	0,138 b B	0,103 b D
Recría	0	251 a D	28,2 a B	0,611 a C	0,497 a C
	0,3	247 a D	29,1 a B	0,609 a C	0,470 a C
	3	246 a D	28,8 a B	0,606 a C	0,456 a C
	30	215 b C	25,0 a B	0,556 b D	0,452 a B
	300	116 d D	2,2 c A	0,456 c B	0,264 b B
	Monensina	167 c C	14,4 b A	0,539 b B	0,292 b C
Engorde	0	347 a B	35,8 a A	0,873 a A	0,818 a A
	0,3	347 a B	36,5 a A	0,839 a A	0,811 a A
	3	352 a B	37,2 a A	0,862 a A	0,809 a A
	30	319 a A	35,2 a A	0,808 a A	0,794 a A
	300	237 c A	2,2 c A	0,765 b A	0,608 c A
	Monensina	285 b A	18,7 b A	0,828 a A	0,676 b A
Tambo	0	385 a A	39,3 a A	0,710 a B	0,542 a B
	0,3	386 a A	41,8 a A	0,753 a B	0,545 a B
	3	381 a A	36,8 a A	0,750 a B	0,537 a B
	30	331 b A	30,9 b B	0,715 a B	0,486 b B
	300	225 d B	2,7 d A	0,593 b A	0,234 c B
	Monensina	276 c A	16,4 c B	0,650 b B	0,267 c C
Error estándar		9,5	1,66	0,0180	0,0264
P-valor	Sustrato	<0,0001	0,0218	<0,0001	<0,0001
	Tratamiento	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
	Sust. x Trat.	0,0338	0,0013	0,0003	0,0113

Letras minúsculas distintas en la misma columna indican diferencias entre dosis dentro de un mismo sustrato (DGC,  $P < 0,05$ ). Letras mayúsculas distintas en la misma columna indican diferencias entre sustratos para una misma dosis (DGC,  $P < 0,05$ ). <sup>1</sup>Dosis de aceite esencial expresada en  $\mu\text{l/l}$ . <sup>2</sup>DMO: Digestibilidad de la materia orgánica; <sup>3</sup>D-FDNmo: Digestibilidad *in vitro* de la fibra en detergente neutro libre de cenizas.

En las Figuras 3.2 y 3.3 se presentan las producciones relativas a las dosis cero (sin AE) con el agregado de dosis crecientes de AE de *L. turbinata* y de *T. minuta* respectivamente, de la producción de gas y metano y de la digestibilidad. En la dosis intermedia (30 µl/l) el AE de *L. turbinata* redujo la producción de gas total en distinta proporción (entre 15 y 25%) según el sustrato; mientras que en el AE de *T. minuta* la reducción no superó el 15% para ningún sustrato. Lo mismo ocurrió para la producción de metano, ya que en el AE de *L. turbinata* la reducción estuvo en el rango entre 30 y 55%, mientras que para *T. minuta* la máxima inhibición en esta dosis fue del 30% en el sustrato de cría. Con la mayor dosis (300 µl/l) el rango de reducción de la producción de gas fue similar en ambos AE, con la mínima reducción en el sustrato de engorde (30%) y la máxima en el sustrato de cría (80%). En esta dosis la reducción de la producción de metano generada por ambos AE estuvo alrededor del 90% para todos los sustratos. La reducción de la digestibilidad de la materia orgánica en ambos AE fue máxima para el sustrato de cría y mínima para el de engorde, pero en distintas proporciones según el AE. En *L. turbinata* la reducción fue de 54 y 22% respectivamente, mientras que *T. minuta* la reducción fue de 63 y 12% respectivamente. Algo similar ocurrió con la digestibilidad de la fibra, donde la reducción debido al agregado de 300 µl/l del AE de *L. turbinata* fue de 66, 51 y 67% en los sustratos de cría, engorde y tambo respectivamente; mientras que con *T. minuta* la reducción fue de 72, 26 y 57% para los mencionados sustratos.

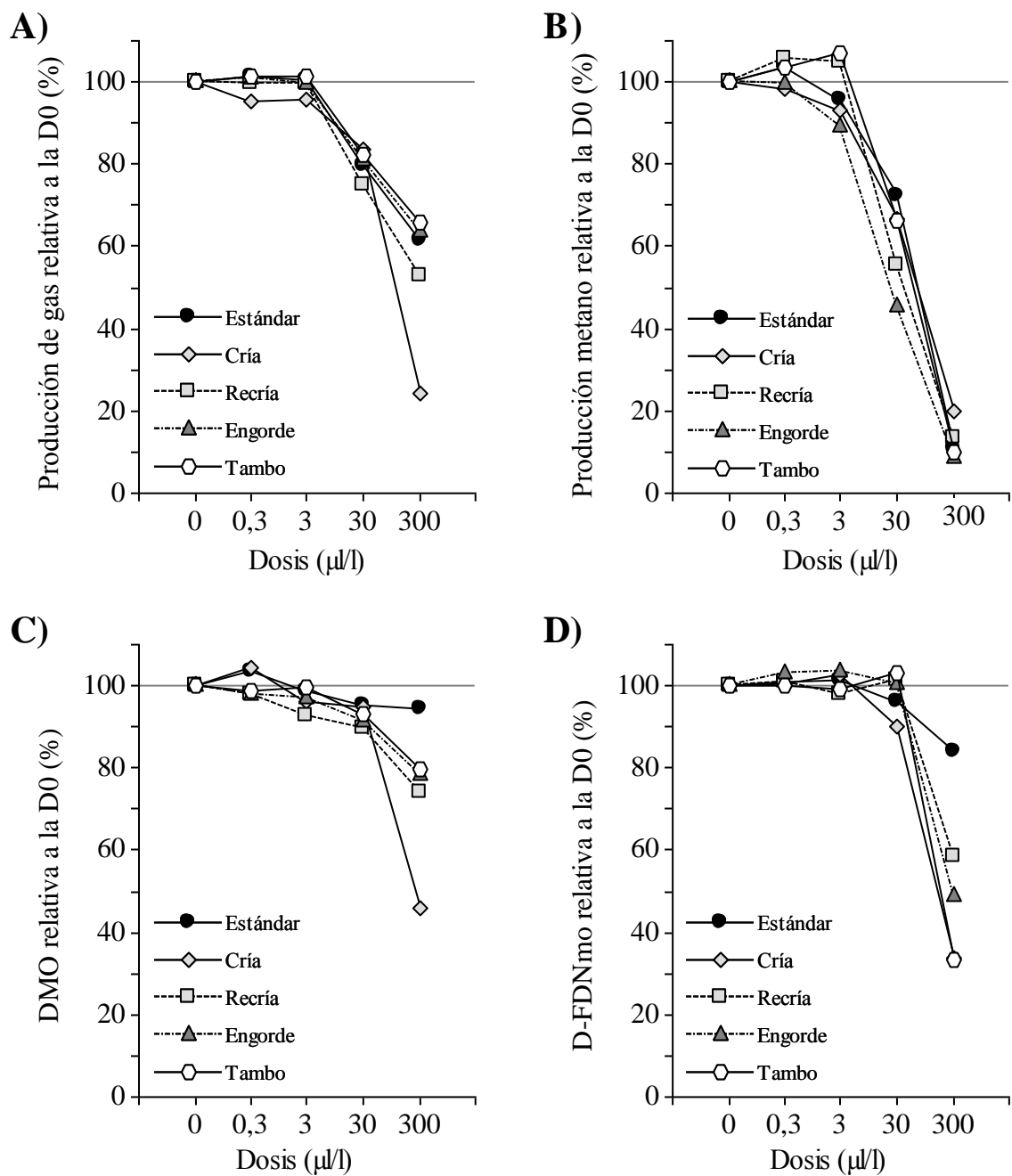


Fig. 3.2. Reducción relativa a la dosis cero (sin AE) para: A) producción de gas total; B) producción de metano; C) digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y D) digestibilidad de la fibra en detergente neutro libre de cenizas, con dosis crecientes de aceite esencial de *Lippia turbinata* en la fermentación *in vitro* de sustratos representantes de dietas de sistemas de producción ganadera: cría (rombo gris), recría (cuadrado gris), engorde (triángulo gris) y tambo (hexágono blanco), y de un sustrato estándar de determinaciones de laboratorio (círculo negro).



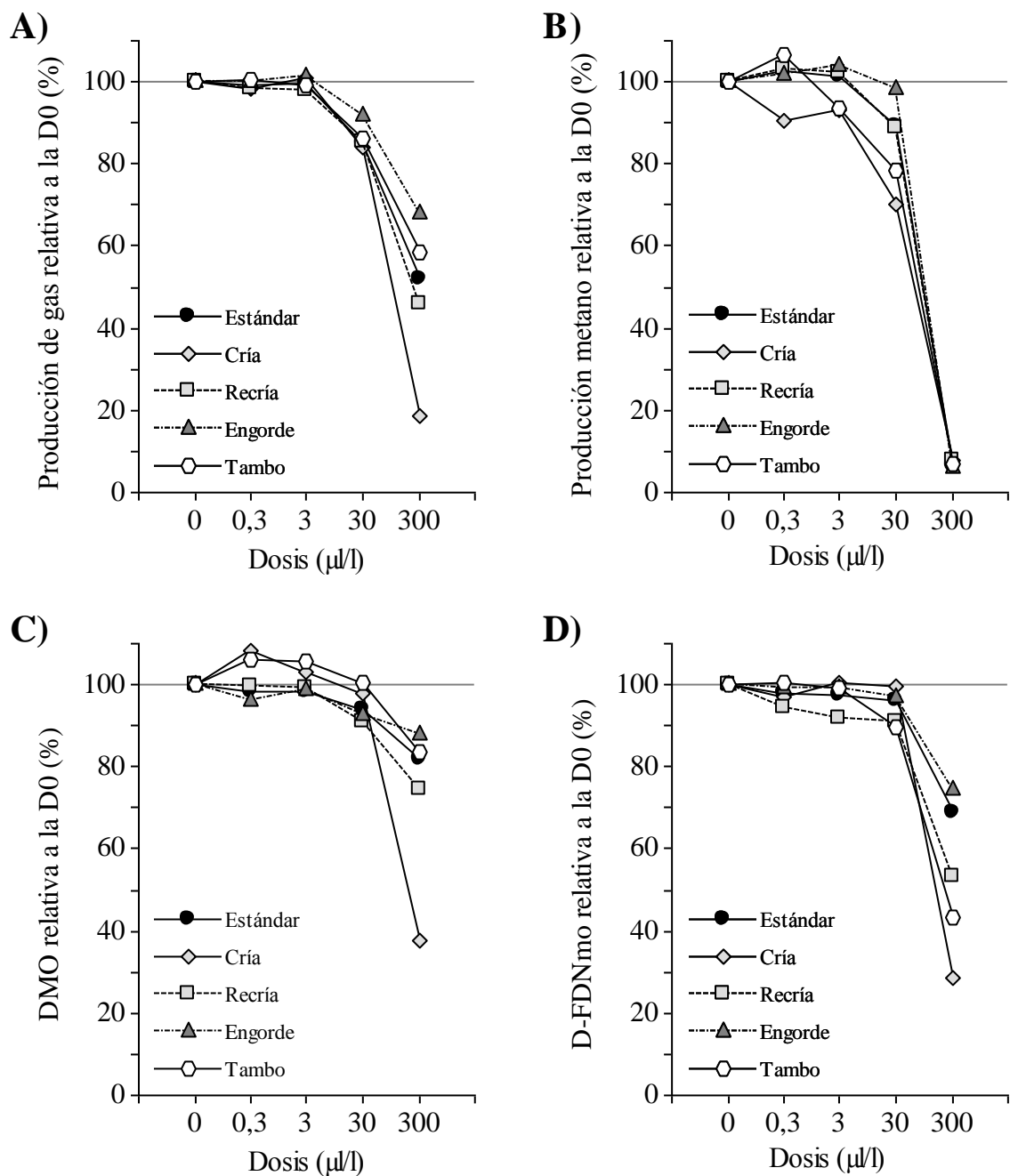


Fig. 3.3. Reducción relativa a la dosis cero (sin AE) para: A) producción de gas total; B) producción de metano; C) digestibilidad de la materia orgánica (DMO) y D) digestibilidad de la fibra en detergente neutro libre de cenizas, con dosis crecientes de aceite esencial de *Tagetes minuta* en la fermentación *in vitro* de sustratos representantes de dietas de sistemas de producción ganadera: cría (rombo gris), recría (cuadrado gris), engorde (triángulo gris) y tambo (hexágono blanco), y de un sustrato estándar de determinaciones de laboratorio (círculo negro).

## DISCUSIÓN

Las condiciones del ambiente ruminal, por ejemplo la concentración de nutrientes y el pH, pueden variar según el sustrato que se fermenta, y esto podría tener alguna acción sobre la efectividad de los AE. Sin embargo, la interacción entre la adición de AE y el sustrato de incubación ha sido poco explorada hasta el momento (Mateos *et al.*, 2013). En este estudio, los dos AE seleccionados en la etapa exploratoria se evaluaron *in vitro* en combinación con distintos sustratos representantes de sistema de producción ganadera y con el sustrato estándar de laboratorio previamente utilizado.

La interacción sustrato por dosis fue significativa para todas las variables en estudio en ambos AE, lo que confirma que la respuesta del aditivo está condicionada por el sustrato de fermentación (Klevenhusen *et al.*, 2012). Es esperable que aun partiendo de un mismo inóculo ruminal, en la fermentación *in vitro* de sustratos con distinta composición química se desarrollen y mantengan comunidades microbianas diferentes, y con ello, los productos y las condiciones del medio de incubación también variarán. Cardozo *et al.* (2005) determinó que el efecto de los extractos de plantas sobre la fermentación microbiana ruminal depende del pH del medio, lo que puede explicar la diferencia observada en el efecto del agregado de cada AE según el sustrato que se fermentó.

En todos los sustratos, el efecto del agregado de ambos AE dependió de la dosis, pero la magnitud de la respuesta varió entre los AE. A 30  $\mu\text{l/l}$ , el AE de *L. turbinata* fue más efectivo que *T. minuta* para reducir la producción de metano en todos los sustratos, sin efectos sobre la digestibilidad (excepto por un 10% de reducción en la digestibilidad de la materia orgánica del sustrato de engorde). En la mayor dosis (300  $\mu\text{l/l}$ ), el efecto depresor del AE de *L. turbinata* sobre la digestibilidad de la materia orgánica y de la fibra en el sustrato de engorde fue cerca del doble en comparación con la que generó la adición de la misma dosis del AE de *T. minuta*. Lo mismo ocurrió con la digestibilidad de la fibra del sustrato de tambo. A la inversa, en el sustrato de cría el AE de *T. minuta* redujo la digestibilidad de la materia orgánica cerca de 10 puntos porcentuales más que cuando se agregó *L. turbinata*. Además, solo *T. minuta* redujo la digestibilidad del sustrato estándar.

Los sustratos de engorde y tambo fueron los de mayor valor nutritivo, y como era de esperar, tuvieron un menor pH del medio de fermentación al final de la incubación. A pesar de que esto solo se midió en el ensayo con *L. turbinata*, se esperaría que se hubiese generado la misma diferencia en el ensayo con *T. minuta*. Las diferencias observadas en la reacción frente al pH del medio podrían estar asociadas con la proporción contrastante de compuestos oxigenados entre ambos AE.

A pesar de que el mecanismo de acción de los AE no está completamente dilucidado, uno de los sitios de acción descritos es la bicapa fosfolipídica (Benchaar *et al.*, 2008), o también a nivel intracelular (Dorman y Deans, 2000), por lo que sus propiedades antimicrobianas están asociadas a su carácter lipofílico. En el trabajo de Cardozo *et al.* (2005), una de las hipótesis fue que la diferencia en respuesta a los extractos de plantas según el pH puede estar relacionado al estado disociado (hidrofílico) o no disociado (hidrofóbico) de las moléculas activas. Si el mecanismo de acción está asociado con la membrana fosfolipídica, solo en la forma no disociada de las moléculas los aditivos serían capaces de interactuar con la doble capa de la membrana celular. Cuando el pH desciende, los ácidos tienden a estar no disociados y son más hidrofóbicos, por lo que interactúan más fácilmente con las membranas celulares y generan su acción antimicrobiana. Esto podría explicar lo observado con el agregado de *L. turbinata*, que mostró una mayor actividad sobre los sustratos de engorde y tambo, que fueron los que generaron ambientes de menor pH. Por otro lado, el AE de *T. minuta* mostró mayor potencia sobre el sustrato estándar y el de cría, que presentaron un pH cercano a la neutralidad. Esto indique que uno de los factores que condiciona la interacción entre AE y el sustrato es la identidad química de los componentes que conforman dicho AE.

Al comparar igual dosis y sustrato, las reducciones relativas a la dosis 0 (sin agregado de AE) fueron de mayor magnitud para la producción de metano que para la producción de gas total, probablemente por supresión selectiva de microorganismos metanogénicos (Patra y Yu, 2012, 2015; Cobellis *et al.*, 2016a). En el mismo sentido, el agregado de los AE tuvo mayor impacto sobre la digestibilidad de la fibra, que sobre la digestibilidad de la materia orgánica. Se ha reportado una mayor sensibilidad al agregado

de AE sobre poblaciones de bacterias celulolíticas respecto de otros microorganismos (Patra y Yu, 2012, 2015).

Limoneno fue el principal componente identificado para *L. turbinata* (62%) y también estuvo presente en *T. minuta*, siendo el único componente en común entre ambos AE. En base a la concentración específica de limoneno, las dosis evaluadas en el presente trabajo para *L. turbinata* fueron: 0,186, 1,86, 18,6 y 186 µl/l. Castillejos *et al.* (2006) evaluaron dosis crecientes de limoneno (5, 50, 500 y 5000 mg/l) en la fermentación ruminal *in vitro* (24 hs). El sustrato utilizado fue 60:40 forraje:concentrado (180, 300 y 220 g/kg PB, FDN y FDA respectivamente), similar a la composición química del sustrato estándar en el presente estudio, pero con un pH más ácido del medio al final de la incubación comparado al que se observó en este trabajo (6,46 vs. 6,74). Limoneno a 50 y 500 mg/l redujo la concentración total de AGV, sugiriendo que a esas dosis resulta tóxico para las bacterias ruminales; mientras que dosis mínima (5 mg/l) no modifican la fermentación microbiana ruminal. En otro experimento, Castillejos (2005) evaluó limoneno en el mismo rango de dosis, pero en un sustrato de 10:90 forraje:concentrado (160, 250 y 110 g/kg de PB, FDN y FDA respectivamente) similar a la composición química del sustrato de tambo en el presente estudio, y encontró un aumento del pH con las dosis de 50 y 500 mg/l, sin afectar otros parámetros de fermentación. Las condiciones del medio de fermentación podrían ser la causa de las diferencias en la toxicidad de limoneno.

En el AE de *Citrus aurantifolia* el limoneno es el componente que se encuentra en mayor proporción (51%). Similar al presente estudio, la adición de 300 mg/l de *C. aurantifolia* redujo la producción de metano *in vitro* en la fermentación de un forraje tropical de baja calidad (105, 679 y 347 g/kg de PB, FDN y FDA respectivamente) (Kouazoude *et al.*, 2015). Pero en ese caso, la reducción fue de alrededor del 10%, mientras que a igual dosis el AE de *L. turbinata* generó en el sustrato de cría una reducción del 80%, indicando que otros compuestos en este AE pueden tener bioactividad o un efecto sinérgico con limoneno (Burt, 2004). Cattani *et al.* (2016) evaluaron los efectos de limoneno sobre la producción de metano en un ensayo de fermentación ruminal *in vitro*

usando un sustrato que simulaba a una dieta de vaca lechera (158, 361 y 192 g/kg de PB, FDN y FDA respectivamente). Similar al presente trabajo, la adición de 200 mg/l de limoneno redujo la digestibilidad de la materia seca y de la fibra en detergente neutro, la producción de gas total y de metano, así como la concentración de amoníaco, y la producción y composición de AGV. Joch *et al.* (2016) evaluaron limoneno a 1000  $\mu$ l/l en un experimento *in vitro* de fermentación corta con un sustrato compuesto por silaje de alfalfa, silaje de maíz y concentrado en una relación de 35:35:30 (162, 366 y 242 g/kg de PB, FDN y FDA respectivamente), y encontraron una reducción de la producción de metano sin efectos adversos sobre la producción de AGV. En dicho estudio los aditivos se inocularon directamente sobre el medio de incubación, sin previa disolución en solvente. En ensayos previos realizados en el grupo de trabajo se concluyó que el uso de solvente, como el etanol, puede facilitar la dilución de la fracción lipofílica de los AE en el medio de incubación, aumentando su bioactividad (García *et al.*, 2015).

Acetato de bornilo fue el segundo componente en mayor proporción encontrado en *L. turbinata* (8%). En el estudio de Joch *et al.* (2016), el acetato de bornilo fue definido como el componente más promisorio de los 11 compuestos de AE evaluados, dentro de los que se incluían diferentes grupos químicos, como alcoholes (linalol), aldehídos (citril), éteres (1,4-cineol), hidrocarburos (p-cimeno, limoneno,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno,  $\gamma$  terpineno), y compuestos fenólicos (carvacrol, eugenol). En dicho estudio, todas las dosis evaluadas de acetato de bornilo (500, 1000 y 2000  $\mu$ l/l) disminuyeron la producción de metano sin afectar la producción de AGV respecto del control. En dicho estudio se menciona que los compuestos fueron agregados directamente sobre el medio de incubación y no se aclara si se realizaban mezclas periódicas o agitación del medio. Debido al carácter lipofílico y de baja densidad de los componentes de los AE, es posible que no se haya logrado una correcta inmersión de los compuestos en el seno del medio de incubación. Estos factores pueden haber reducido el efecto de este componente sobre los microorganismos ruminales y explicar la menor actividad relativa del acetato de bornilo a tan elevadas dosis. La actividad antimicrobiana de este compuesto puede estar relacionada a la presencia de la porción de acetato en su estructura (Dorman y Deans, 2000), la cual aumenta la actividad antimicrobiana en comparación con su compuesto de origen. A pesar de que estas dosis

fueron significativamente mayores que en el presente estudio, el acetato de bornilo puede haber contribuido en la bioactividad del AE obtenido de *L. turbinata*.

Carvona fue el tercer componente presente en *L. turbinata* (6%), el cual es un componente activo frente a bacterias Gram positivas y negativas, debido a su gran solubilidad en agua, a la presencia del grupo cetónico y una unión doble en su molécula (Dorman y Deans, 2000). *Anethum graveolens* (estandarizado a 47% de carvona) a 3000 mg/l no tuvo efecto sobre la concentración total de AGV, pero disminuyó la proporción molar de acetato y de propionato, mientras que aumentó la proporción molar de butirato (Busquet *et al.*, 2006). La actividad antimicrobiana de *A. graveolens* fue atribuida a la presencia de carvona como compuesto principal.

La capacidad antimicrobiana de otros compuestos individuales presentes en el AE de *L. turbinata* también fue reportada para  $\alpha$  terpineol, linalol,  $\alpha$  pineno, sabineno,  $\beta$  cariofileno y  $\beta$  ocimeno; sin embargo, no se encontraron referencias de evaluaciones de estos compuestos en la fermentación ruminal y/o en la actividad de las comunidades microbianas en el rumen.

Los compuestos presentes en *L. turbinata* son los que generalmente se observan en la composición de otros AE, mientras que la composición del AE de *T. minuta* es una característica particular y distintiva de dicho género (Chamorro *et al.*, 2008). La actividad antimicrobiana del AE de *T. minuta* ha sido previamente atribuida a las fracciones con grupo funcional cetona (Héthélyi *et al.*, 1986; Senatore *et al.*, 2004), explicado por la presencia de oxígeno en la estructura, lo que se ha reportado que tiene la capacidad de aumentar las propiedades antimicrobianas de los terpenos (Dorman y Deans, 2000). Los niveles de verbenona, *cis* y *trans* tagetonas y piperitenona encontrados probablemente sean suficientes para ser responsables de la actividad antimicrobiana observada. No se cuenta con información de la capacidad de dichos compuestos para modificar la actividad microbiana ruminal hasta el momento. Mayores avances en el entendimiento de los compuestos activos dentro de este AE se obtendrían a través de su fraccionamiento y

evaluación de la actividad antimicrobiana de cada uno de sus componentes individuales.

A pesar de que algunos compuestos están presentes en baja proporción, ciertos grupos químicos o compuestos podrían resultar de interés. Aquellos con el grupo funcional epóxido (óxido de cariofileno, óxido de pineno y óxido de piperitenona), presentes en ambos AE, pueden tener bioactividad. Un grupo epóxido es un éter cíclico compuesto por un anillo de tres átomos. Este anillo se aproxima a un triángulo equilátero, que hace torsión de la molécula, y por lo tanto, es un compuesto altamente reactivo, inclusive más que otros éteres. Otros compuestos que podrían ser de interés son cariofileno y sabineno. El primero es un sesquiterpeno que se caracteriza por poseer un anillo ciclobutano, así como un doble enlace *trans* en un anillo de ocho átomos, lo que provoca que tenga mayor tamaño que otros monoterpenos y puede contribuir en la actividad antimicrobiana (Dewick, 2002). Por otro lado, el sabineno es un isómero óptico de la tujona, compuesto altamente tóxico para los microorganismos ruminales (Chizzola *et al.*, 2004). Dentro de los monoterpenos, el grupo de los tujanos, son considerados inusuales ya que poseen un anillo ciclopropano en un esqueleto bíciclico (Dewick, 2002).

Este estudio confirma que la respuesta de los AE depende del sustrato y de la dosis. Además, se propone que debe existir una interacción entre las condiciones del medio de fermentación (que dependen del valor nutritivo del sustrato y de la fuente de inóculo) y el perfil químico del AE, específicamente en su proporción de compuestos oxigenados. En tal sentido, en la búsqueda de explicar diferencias entre estudios, se deberá prestar atención al análisis de los procedimientos experimentales, especialmente aquellos que puedan ser fuente de variación de las condiciones de fermentación, como la composición química del sustrato, los animales donantes y su dieta, la relación fluido ruminal:*buffer*, entre otros.

## CONCLUSIONES

La adición de aceites esenciales de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* en el medio de incubación resultó efectiva para la disminución de la producción de metano en la fermentación *in vitro* de una serie de sustratos, por lo que resulta de interés continuar con su estudio como aditivos para la disminución de metano en rumiantes.

El efecto de la adición de los aceites esenciales en la fermentación ruminal *in vitro* depende de la composición química del aceite esencial, de la dosis, del sustrato y de las condiciones del ambiente de fermentación. La elección del aceite esencial a utilizar como aditivo para modular la fermentación ruminal dependerá del sistema de producción donde se aplique como estrategia, para lo que habrá que considerar las características de los componentes que conforman dicho aceite esencial.



# PERSISTENCIA DE LOS EFECTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *LIPPIA TURBINATA* Y *TAGETES* *MINUTA* SOBRE CULTIVOS SEMI-CONTINUOS

## INTRODUCCIÓN

Los AE han demostrado tener la capacidad para inhibir la producción de metano tanto *in vitro* como *in vivo* (Klevenhusen *et al.*, 2012; Khiaosa-Ard y Zebeli, 2013). Sin embargo, se ha sugerido que la acción de los AE sobre los microorganismos ruminales puede disminuir o perderse con el tiempo, lo que implicaría una limitante para su desarrollo y aplicación como aditivos naturales (Bodas *et al.*, 2012). La ausencia de efectos en estudios de mayor duración puede deberse a cambios en la estructura de la comunidad ruminal o a adaptación de algunas especies, lo que provocarían la pérdida de la efectividad del aditivo para inhibir la producción de metano (Hook *et al.*, 2010). Más aún, es posible que las bacterias ruminales transformen algunos de los componentes activos a sustancias inertes (Chizzola *et al.*, 2004). La capacidad de los microorganismos ruminales de desarrollar tolerancia o de degradar los compuestos de los AE representa un gran desafío para el uso de los AE como estrategia de mitigación del metano entérico en rumiantes (Benchaar y Greathead, 2011).

Si se considera que los AE son mezclas que contienen entre 20 y 60 componentes de diferente estructura química y que la composición es propia de cada planta (Dorman y Deans, 2000; Dewick, 2002), el uso rotativo de dos o más AE, con composición química

diferente, podría dificultar la capacidad de las poblaciones microbianas de adaptarse al agente antimicrobiano. La composición química de los AE de *L. turbinata* y *T. minuta* difiere marcadamente, y se ha sugerido previamente que sus mecanismos de acción son también distintos, por lo que rotar su uso podría ser una alternativa para evitar la pérdida de efectividad en el tiempo.

Los sistemas *in vitro* de fermentación continua permiten realizar estudios de mayor duración respecto a los sistemas de fermentación cerrados utilizados en los capítulos previos, a través de los cuales es posible evaluar la capacidad de los microorganismos ruminales de adaptarse al agregado de los AE (Fraser *et al.*, 2007).

El objetivo de este capítulo fue evaluar el impacto de los AE de *L. turbinata* y de *T. minuta* en la producción de metano *in vitro* en un sistema de cultivo semi-continuo, así como la rotación entre ambos AE como estrategia para prolongar su efectividad. La hipótesis fue que a través de rotar la adición de ambos AE se disminuye la capacidad de los microorganismos ruminales de adaptarse a la adición individual de *L. turbinata* o *T. minuta*, y por lo tanto, la inhibición de la producción de metano perdurará por más tiempo.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Diseño experimental

Los AE de *L. turbinata* (LT) y *T. minuta* (TM) fueron evaluados como aditivos para la mitigación de la producción de metano *in vitro* en un sistema de fermentación semi-continuo. Los tratamientos fueron la adición diaria de LT, TM o su uso rotativo cada tres días (TM/LT/TM/LT; denominado TM/LT de ahora en adelante) y un control (sin AE) los que fueron evaluados con la técnica de simulación de rumen (Rusitec, por su nombre en inglés: *rumen simulation technique*) tal como lo describe Czerkawski y Breckenridge (1977). Un objetivo adicional del ensayo (no discutido en el presente trabajo) fue evaluar los efectos de los AE sobre la biohidrogenación de los ácidos grasos, para lo cual el sustrato se enriqueció con aceite vegetal. Para confirmar que esta adición de aceite no afectase la producción de metano, se agregó un control negativo (sustrato sin aceite de girasol y sin AE). Los cinco tratamientos fueron: LT, TM, TM/LT, control (sin AE) y control negativo (sustrato sin aceite de girasol y sin AE), los que fueron asignados aleatoriamente a las unidades experimentales (frascos de fermentación), con tres repeticiones por tratamiento. Los 15 frascos de fermentación se ubicaron en dos baños (ocho en uno y siete en el otro) los cuales se incubaron simultáneamente.

## Aceites esenciales

Se utilizaron los mismos AE de *L. turbinata* y *T. minuta* que se evaluaron en los capítulos anteriores. Brevemente, las plantas se recolectaron en Characato, Córdoba (31°28'77" S, 64°12'32" O); el AE se extrajo por hidrodestilación de la parte aérea de las plantas en plena floración y la composición química se determinó por CG-EM. Se utilizó un equipo Perkin Elmer Clarus 600 (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), equipado con una columna polar, Supelcowax 10 (30 m x 0,25 µm) y luego una columna apolar, DB-5 (30 m x 0,25 µm), con helio como gas portador. Las condiciones para ambas columnas fue: temperatura inicial de 60°C por tres minutos, rampa de 4°C/min, hasta los 240°C y temperatura del inyector 250°C. La identificación de los compuestos se

realizó utilizando la base de datos NIST (versión 3.0), la base de datos de espectros de masas disponibles en la FCA – UNC y otros disponibles en la bibliografía (Adams, 1995). La proporción de cada componente se calculó dividiendo el área de su pico respecto de la sumatoria del área de todos los compuestos detectados.

## **Período experimental**

La duración del experimento fue de 19 días, incluyendo un período de adaptación (días 1 al 7) seguido de 12 días de adición del tratamiento (días 8 al 19) definido como período de tratamiento. El período de adaptación es necesario para permitir la estabilización de las poblaciones microbianas a los frascos de fermentación (Martínez *et al.*, 2011).

## **Fermentadores semi-continuos**

La fermentación se llevó a cabo en el aparato de rumen artificial Rusitec S (Sanshin Industrial Co. Ltd., Yokohama, Japón). Se utilizó el contenido ruminal (CR) de tres ovejas adultas canuladas en rumen, que recibían una dieta de 0,6 kg de paja de avena y 0,2 kg de grano de lupino desde dos semanas previas al inicio del ensayo. El CR se extrajo usando una bomba de vacío 2 hs después de la alimentación matutina y se trasladó inmediatamente al laboratorio en termos precalentados. El CR fue filtrado para eliminar las partículas grandes de alimento y el FR y la fracción de alimento se mezclaron separadamente. Los frascos de fermentación de 1 l de volumen efectivo se llenaron con 360 ml de *buffer* McDougall precalentado de pH 8,2 (McDougall, 1948), modificado para contener 1,0 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , según lo sugerido por Fraser *et al.* (2007), y 240 ml de FR filtrado (volumen de trabajo inicial: 600 ml). En el primer día, una bolsa (7 x 17 cm, 100 micras de tamaño de poro) con la fracción sólida del CR (50 g, en base húmeda) y una bolsa con el sustrato experimental (15 g, en base MS) se colocaron dentro de cada recipiente de fermentación. Cada recipiente de fermentación se insufló con nitrógeno para mantener las condiciones anaeróbicas. Los fermentadores se dividieron en dos baños maría y la temperatura de fermentación se mantuvo a 39°C durante todo el experimento.

Después de 24 hs, la bolsa de CR sólido se reemplazó con una bolsa con 15 g del sustrato experimental. Desde ese momento, se reemplazó una bolsa por día, permitiendo que cada una permanezca en el fermentador por 48 hs. El sustrato utilizado fue un pellet diseñado como dieta para engorde de corderos (EasyOne, Milne Feeds, Welshpool, Western Australia, Australia), previamente molido (malla: 4 mm), y su composición química fue 930, 149, 509 y 707 g/kg MS de MO, PB, aFDN y DMS<sub>iv</sub> respectivamente. Desde el período de adaptación, se suministró 15 g de sustrato enriquecido con 200 µl de aceite de girasol (1 g/100 g MS) agregado directamente en el sustrato previo al cambio de la bolsa (doce fermentadores), mientras que los frascos de fermentación del control negativo (n = 3) solo recibieron los 15 g MS del sustrato.

Se prepararon soluciones de cada AE en etanol al 70% a la concentración necesaria para lograr la dosis final en el medio de incubación y se suministraron diariamente a los fermentadores en el momento de cambio de la bolsa de alimento desde el día 7 (última medición sin tratamiento, definido como día 0) hasta el final del experimento. La dosis diaria de AE fue de 300 µl/l, equivalente a 12 µl/g MS. En los frascos de control (n = 6) se suministró una cantidad equivalente (1 ml) de etanol al 70%.

Se infundió saliva artificial continuamente en los fermentadores a una tasa de dilución de 4%/h utilizando una bomba peristáltica (Thermo Scientific FH100M Series, Thermo Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Durante todo el ensayo el pH del medio de fermentación se monitoreó diariamente para mantenerlo alrededor de 6,5 a 6,9. El efluente de cada frasco de fermentación se recogió en botellas de 1 l con tapones con dos orificios (Alltech®, Columbia, Maryland, Estados Unidos) los cuales fueron colocados en un refrigerador para detener la actividad microbiana. La acumulación de efluentes se midió diariamente después del cambio de la bolsa de sustrato.

## **Mediciones, toma y análisis de muestras**

### *a) Producción de gas y metano*

El gas se recogió en bolsas reutilizables de 4000 ml unidos a cada botella de efluentes y se cambiaron diariamente justo después de cambiar la bolsa de alimento. La producción de gas total de cada fermentador se determinó por el vaciado de la bolsa utilizando una jeringa de 200 ml. Justo antes de la medición de la producción de gas, se determinó la concentración de metano por CG acoplando la bolsa directamente a un equipo Micro GC VARIAN CP-4900 (Varian Inc., Palo Alto, California, Estados Unidos). La temperatura del inyector fue de 50°C, la de la columna PoraPLOT Q (10 m x 0,25 mm) fue de 60°C, mientras que la temperatura del detector de conductividad térmica fue de 60°C. El gas portador fue helio, con un flujo de 24 ml/min. El contenido de metano se calculó a través de una curva de regresión generada con tres niveles de metano (5, 10 y 20%) desde un estándar externo de mezcla de gases (20% CH<sub>4</sub>, 30% de H<sub>2</sub> y 30% de CO<sub>2</sub>).

### *b) Digestibilidad del sustrato*

Inmediatamente que se retiraban las bolsas de alimento de los fermentadores se colocaron en hielo para frenar la actividad microbiana. Luego se lavaron con agua fría del grifo hasta que el agua saliera clara y se secaron a 60°C durante 48 hs. La digestibilidad aparente de la MS se calculó a partir de la pérdida de peso respecto del material incubado. En los sustratos y residuos de los días 2, 6, 10 y 14 (correspondientes a las bolsas de alimento que fueron colocadas en los días 0, 4, 8 y 12) se analizó el contenido de aFDN y de PB, para poder determinar la digestibilidad de la FDN y digestibilidad aparente de la PB respectivamente. El análisis de la aFDN y de la PB se realizó con la metodología descrita en el Capítulo II. Brevemente, el análisis de la aFDN se realizó según Goering y Van Soest (1970) y la PB se determinó a través del método de Kjeldahl (AOCS: 954.01, 1998).

### *c) Determinación de amoníaco, ácidos grasos volátiles y pH*

En los días 0, 4, 8 y 12 de tratamiento se tomaron muestras de la fracción líquida 3

hs post-alimentación y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta posterior análisis de amoníaco (1 ml con 200  $\mu\text{l}$  de HCl 2M) y AGV (1 ml con 200  $\mu\text{l}$  de NaOH 1M). Las muestras se tomaron directamente de un puerto ubicado en la tapa de los frascos de fermentación. La concentración de amoníaco se determinó por espectrometría con el kit de prueba Boehringer Mannheim 1112732 (R-Biopharm AG, Darmstadt, Hesse, Alemania) en un autoanalizador Cobas Mira S (Roche Diagnostics, M Hoffmann-La Roche Ltd., CH- 4002, Basilea, Basel, Suiza) usando los principios del análisis enzimático descrito por Bergmeyer y Beutler (1985). Para la determinación de AGV, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se analizó por CG en un equipo Agilent 6890 Series (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, California, Estados Unidos) equipado con una columna capilar HP-FFAP (30 m x 0,53 mm). El gas portador fue hidrógeno, con un flujo de 6,6 ml/min. La temperatura del inyector fue de  $260^{\circ}\text{C}$ , el horno estaba a  $240^{\circ}\text{C}$ , mientras que la temperatura del detector de ionización de llama fue  $265^{\circ}\text{C}$ . Los AGV de cadena corta ramificada se calcularon como la suma del ácido isobutírico y del isovalérico. El pH del fluido se midió diariamente, utilizando un medidor de pH (EcoTestr Modelo WD-35423-10, Oakton Instruments, Vernon Hills, Illinois, Estados Unidos), inmediatamente antes de cambiar la bolsa de alimento y 3 hs después (durante la toma de muestra de FR).

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con un modelo lineal general y mixto con medidas repetidas en el tiempo, usando la plataforma R (DCOM) dentro del *software* InfoStat (2016). El modelo mixto consideró al tratamiento, día y su interacción como efectos fijos, mientras que al baño y al frasco de fermentación como efectos aleatorios. Se probaron distintas estructuras de covarianza para cada variable y se seleccionó aquella que resultó en menor valor de los criterios de información Akaike y Bayesiano. Las diferencias entre tratamientos se evaluaron con la prueba de comparación múltiple de medias de DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002) ( $\alpha = 0,05$ ). Diferencias entre medias con  $0,05 < P < 0,10$  se aceptaron como representantes de tendencias.

## RESULTADOS

En el día 0 (antes de aplicar el tratamiento), no se detectaron diferencias significativas entre los frascos de fermentación ( $n = 15$ ) para ninguna de las variables evaluadas. El principal objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de la adición individual o combinada (rotativamente) de los AE sobre la producción de metano. El perfil de ácidos grasos de cadena larga fue determinado, pero no se presentaron en el marco de la tesis. El control negativo (sustrato sin aceite de girasol y sin AE) difirió del control (sustrato enriquecido con aceite de girasol, sin AE) solo en la producción de metano expresada por g de FDN degradada (26,0 y 21,3 ml/g FDN degradada, respectivamente) y en pH (6,81 y 6,74, respectivamente); mientras que la digestibilidad de la FDN tendió ( $P = 0,090$ ) a ser menor (0,242 y 0,268 g/g respectivamente). El resto de las variables fue similar con o sin el agregado de aceite de girasol (información no presentada).

### Composición química de los aceites esenciales

La composición química de ambos AE se describió en los Capítulos II y III (Tablas 2.3, 3.2 y Anexo 1). Brevemente, el principal grupo funcional en el AE de *L. turbinata* fue el de los hidrocarburos, con cuatro componentes representando el 71% del total de la composición. Los compuestos detectados en mayor proporción fueron limoneno (62%), seguido por acetato de bornilo (8%) y carvona (6%). Para el AE de *T. minuta* se detectaron cuatro grupos funcionales, siendo las cetonas las más abundantes (81%). Los principales compuestos detectados fueron verbenona (42%), *cis* tagetona (28%), limoneno (6%) y *trans* tagetona (6%). Los terpenos oxigenados representaron casi el 90% de la composición.

### Metano, producción de gas y digestibilidad del sustrato

El efecto de los AE sobre la producción de metano, producción de gas total y la digestibilidad del sustrato se presenta en la Tabla 4.1. La interacción entre tratamiento y día fue significativa para la concentración de metano (ml/100 ml; Figura 4.1A), y para la



producción diaria de metano (ya sea expresada en base a MS incubada o degradada). Comparado con el control, la concentración de metano se redujo un 60% con LT y más del 75% para TM y TM/LT en el primer día de adición del tratamiento, y continuó disminuyendo, alcanzando más de un 90% de disminución desde el día 6 en adelante para los tres tratamientos con AE. Cuando se expresó en base a la FDN degradada, la producción de metano también se redujo más de un 90%, pero para esta variable no se detectó interacción de tratamiento por día.

Para la producción de gas total, la interacción de tratamiento y día fue significativa (Figura 4.1B). LT produjo un 24 y 10% menos gas que el control en los días 1 y 10, respectivamente. El tratamiento de TM produjo una reducción entre 10 y 30% de la producción de gas total comparado al control en los días 1 al 5, y en el día 10. Mientras que TM/LT produjo entre 10 y 40% menos gas que el control en los días 1, 2, 4 y 12.

En comparación al control, la digestibilidad aparente de la MS se redujo alrededor de un 5% con el suministro de AE y fue afectado por día de incubación, pero no se detectó interacción entre tratamiento y día (Figura 4.1C). La digestibilidad de la FDN fue afectada por día, siendo un 10% superior en el día 8 (información no presentada) y tendió ( $P = 0,090$ ) a ser menor en los tratamientos con AE en comparación al control (alrededor de un 15%). No se detectó efecto del tratamiento, del día o su interacción para la digestibilidad aparente de la PB.

Tabla 4.1. Efecto de la adición de aceite esencial de *Lippia turbinata* (LT), *Tagetes minuta* (TM) o su uso rotativo (TM/LT) sobre la producción de metano, la producción de gas total y la digestibilidad del sustrato fermentado en un Rusitec. Dosis: 300 µl/l. Media<sup>1</sup> ± E.E.<sup>2</sup>

	Pre-tratamiento <sup>3</sup>	Período de tratamiento <sup>4</sup>				P-valor <sup>5</sup>						
		Control	LT	TM	TM/LT	T	D	T x D				
<b>Metano</b>												
ml/100 ml de gas total	3,36 ±0,153	5,25 <sup>a</sup> ±0,103	0,61 <sup>b</sup> ±0,039	0,49 <sup>b</sup> ±0,039	0,55 <sup>b</sup> ±0,039	<0,0001	<0,0001	<0,0001				
ml/día	25,42 ±1,746	44,97 <sup>a</sup> ±1,614	4,90 <sup>b</sup> ±0,344	3,64 <sup>c</sup> ±0,344	4,11 <sup>c</sup> ±0,344	<0,0001	<0,0001	<0,0001				
ml/g MS	1,69 ±0,115	3,01 <sup>a</sup> ±0,109	0,33 <sup>b</sup> ±0,024	0,24 <sup>c</sup> ±0,024	0,27 <sup>c</sup> ±0,024	<0,0001	<0,0001	<0,0001				
ml/g MS degradado	3,13 ±0,217	5,42 <sup>a</sup> ±0,246	0,61 <sup>b</sup> ±0,050	0,47 <sup>b</sup> ±0,050	0,52 <sup>b</sup> ±0,050	<0,0001	<0,0001	<0,0001				
ml/g FDN degradado	14,29 ±0,860	21,27 <sup>a</sup> ±1,545	2,16 <sup>b</sup> ±0,237	2,04 <sup>b</sup> ±0,237	2,44 <sup>b</sup> ±0,266	<0,0001	0,5253	0,5058				
Producción de gas (ml/día)	481,9 ±22,98	580,0 <sup>a</sup> ±34,09	560,4 <sup>a</sup> ±34,09	493,6 <sup>a</sup> ±34,15	513,8 <sup>a</sup> ±34,09	0,3818	<0,0001	0,0141				
<b>Digestibilidad (g/g)<sup>6</sup></b>												
MS	0,535 ±0,0065	0,554 <sup>a</sup> ±0,0058	0,534 <sup>b</sup> ±0,0058	0,525 <sup>b</sup> ±0,0058	0,532 <sup>b</sup> ±0,0060	0,0152	<0,0001	0,2131				
FDN	0,238 ±0,0090	0,268 <sup>x</sup> ±0,0107	0,233 <sup>y</sup> ±0,0107	0,223 <sup>y</sup> ±0,0107	0,226 <sup>y</sup> ±0,0116	0,0903	0,0036	0,6077				
PB	0,722 ±0,0102	0,711 <sup>a</sup> ±0,0177	0,724 <sup>a</sup> ±0,0177	0,725 <sup>a</sup> ±0,0185	0,718 <sup>a</sup> ±0,0177	0,2515	0,1389	0,8741				

<sup>1</sup>Medias con letras diferentes dentro de cada fila en el período de tratamiento indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (DGC; a, b:  $P < 0,05$ ) o tendencias (DGC; x, y:  $0,05 < P < 0,10$ ). <sup>2</sup>E.E.: Error estándar. <sup>3</sup>Valor promedio de todos los fermentadores (n = 15) en el día 0 (antes de la adición de tratamientos). <sup>4</sup>Período de tratamiento: días 4, 8 y 12 para digestibilidad de la FDN y PB y días 1 al 12 para el resto de las variables. <sup>5</sup>Probabilidades para tratamiento (T), día (D) y su interacción (T x D) para el período de tratamiento. <sup>6</sup>MS: Materia seca; FDN: Fibra insoluble en detergente neutro; PB: Proteína bruta.

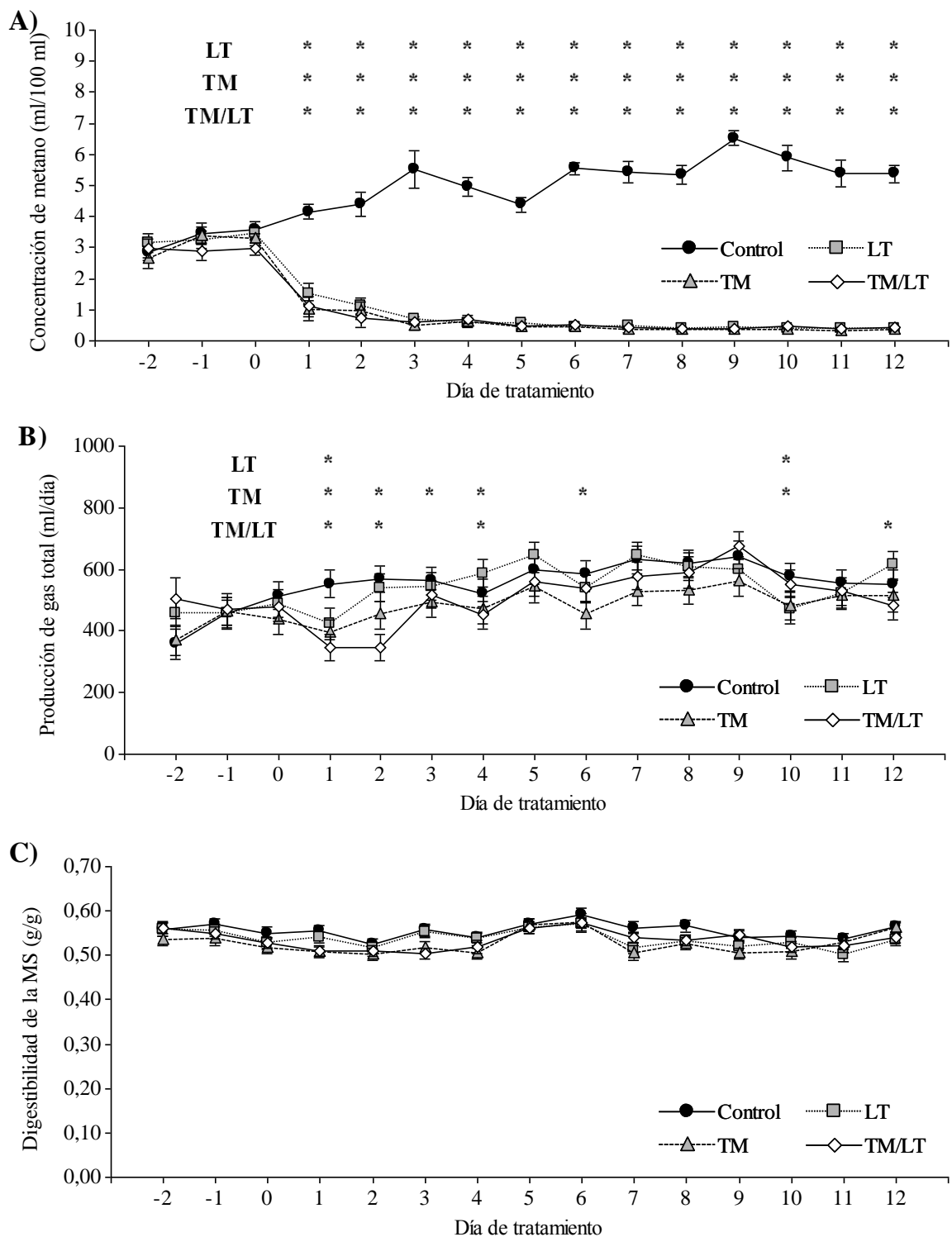


Fig. 4.1. Efecto del agregado de aceite esencial de *Lippia turbinata* (LT), *Tagetes minuta* (TM) y su uso rotativo (TM/LT) sobre la concentración de metano en el gas total producido en un período de 24 hs (A), la producción de gas total (B) y la digestibilidad aparente de la materia seca en 48 hs de incubación (C). Días -2, -1 y 0 corresponden al período de adaptación; los AE fueron suministrados diariamente desde el final del día 0. Las barras representan el error estándar de la media. En A y B: \* Diferencia estadísticamente significativa en comparación al control (DGC;  $P$ -valor < 0,05).

## Parámetros de fermentación

El efecto de la adición de AE sobre la concentración de amoníaco, AGV y pH se observan en la Tabla 4.2. Para la concentración de amoníaco se observó un efecto de tratamiento y de día, pero no de su interacción. La concentración de amoníaco se redujo del día 0 al 12 (de 446 a 345 mg/l; Figura 4.2A). En comparación al control, TM y TM/LT redujeron la concentración de amoníaco un 21 y 14%, respectivamente.

Dentro del período de tratamiento (días 4, 8 y 12) la concentración total de AGV no estuvo afectada por el tratamiento, día o su interacción. Tampoco se observó efecto para las proporciones molares de butirato, iso-butarato, iso-valerato, valerato y AGV de cadena ramificada. La proporción molar de acetato tendió ( $P = 0,054$ ) a decrecer de 52,8 a 49,6 mol/100 mol del día 4 al 12; mientras que la proporción de propionato decreció de 18,7 a 15,3 mol/100 mol. Estas reducciones mantuvieron la relación acetato:propionato sin efecto. En contraste, la proporción molar de caproato aumentó de 4,0 a 7,3 mol/100 mol entre los días 4 y 12, sin efecto de tratamiento o de la interacción de día por tratamiento.

Cuando se incorporó el período pre-tratamiento (día 0), la concentración total de AGV tampoco se vio afectada. En comparación al día 0, se observó un efecto significativo del día, con una reducción del día 0 al 12 en la proporción molar de acetato (de 54,0 a 49,6 mol/100 mol), propionato (de 20,5 a 15,5 mol/100 mol), e iso-butarato (de 0,47 a 0,43 mol/100 mol). Mientras que se observó un aumento en iso-valerato (de 3,8 a 7,8 mol/100 mol), caproato (de 2,9 a 7,3 mol/100 mol) y AGV de cadena ramificada (de 4,2 a 8,2 mol/100 mol). La relación acetato:propionato también estuvo afectada por día de incubación, la cual aumentó de 2,52 a 3,35 del día 0 al 12.

La interacción entre tratamiento y día fue significativa para el pH medido pre y post alimentación, el cual aumentó con la adición de AE en casi todos los días de tratamiento (Figura 4.2B y C).

Tabla 4.2. Efecto de la adición de aceite esencial de *Lippia turbinata* (LT), *Tagetes minuta* (TM) o su uso rotativo (TM/LT) sobre los parámetros de fermentación evaluados en el Rusitec. Dosis: 300 µl/l. Media<sup>1</sup> ± E.E.<sup>2</sup>

	Pre-tratamiento <sup>3</sup>	Período de tratamiento <sup>4</sup>				P-valor <sup>5</sup>		
		Control	LT	TM	TM/LT	T	D	T x D
Amoníaco (mg/l)	446,2 ±7,99	392,9 <sup>a</sup> ±11,19	375,0 <sup>a</sup> ±11,19	312,0 <sup>b</sup> ±11,19	336,0 <sup>b</sup> ±11,19	0,0019	0,0001	0,6558
AGV totales (mmol/l) <sup>6</sup>	121,9 ±3,42	119,6 ±5,08	126,0 ±5,08	118,4 ±5,08	119,3 ±5,08	0,7815	0,3473	0,3792
AGV individuales (mol/100 mol)								
Acetato	54,0 ±1,05	51,3 ±1,48	52,7 ±1,48	49,4 ±1,48	50,5 ±1,48	0,4085	0,0544	0,1495
Propionato	20,5 ±0,72	15,5 ±0,98	16,1 ±0,98	16,3 ±0,98	17,9 ±1,05	0,5282	0,0035	0,9689
Butirato	13,9 ±0,46	13,6 ±0,67	12,9 ±0,67	13,8 ±0,67	14,0 ±0,70	0,8214	0,4605	0,3527
Iso-butilato	0,47 ±0,011	0,42 ±0,025	0,41 ±0,025	0,43 ±0,025	0,41 ±0,023	0,9599	0,1171	0,6814
Iso-valerato	3,77 ±0,222	7,10 ±1,558	5,42 ±1,558	8,49 ±1,558	7,34 ±1,558	0,6781	0,1585	0,2649
Valerato	3,21 ±0,474	5,56 ±2,266	7,54 ±2,563	4,14 ±1,897	4,70 ±1,355	0,8192	0,5956	0,7191
Caproato	2,93 ±0,440	6,48 ±1,425	4,59 ±1,010	7,34 ±1,589	6,11 ±1,194	0,4781	0,0022	0,2580
AGV ramificados	4,23 ±0,221	7,53 ±1,549	5,80 ±1,549	8,92 ±1,549	7,76 ±1,549	0,6586	0,1589	0,2609
Ac:Pr <sup>7</sup>	2,52 ±0,192	3,52 ±0,332	3,33 ±0,257	3,12 ±0,2211	3,01 ±0,1975	0,7016	0,1858	0,8824
pH Pre alimentación	6,72 ±0,015	6,54 <sup>a</sup> ±0,015	6,69 <sup>b</sup> ±0,015	6,71 <sup>b</sup> ±0,015	6,68 <sup>b</sup> ±0,015	0,0001	<0,0001	0,0005
pH 3 hs post alimentación	6,89 ±0,016	6,74 <sup>a</sup> ±0,017	6,82 <sup>b</sup> ±0,017	6,82 <sup>b</sup> ±0,017	6,79 <sup>b</sup> ±0,017	0,0009	<0,0001	0,0011

<sup>1</sup>Medias con letras diferentes dentro de fila en el período de tratamiento indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (DGC; a, b:  $P < 0,05$ ). <sup>2</sup>E.E.: Error estándar.

<sup>3</sup>Valor promedio de todos los fermentadores (n = 15) en el día 0 (antes de la adición de tratamientos). <sup>4</sup>Período de tratamiento: días 1 al 12 para pH; y 4, 8 y 12 para el resto de las variables.

<sup>5</sup>Probabilidades para tratamiento (T), día (D), y su interacción (T x D) para el período de tratamiento. <sup>6</sup>AGV: Ácidos grasos volátiles. <sup>7</sup>Relación Acetato:Propionato.

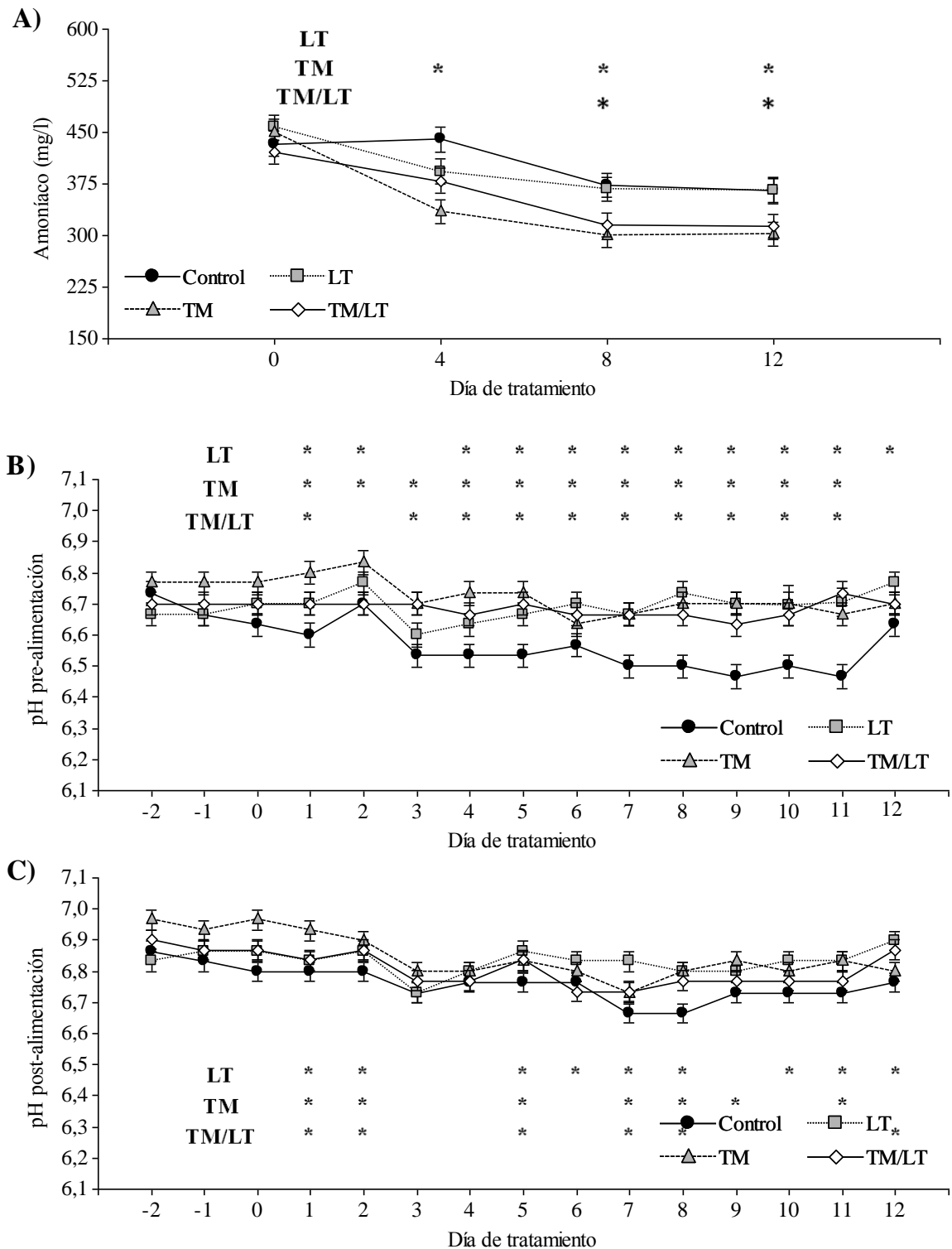


Fig. 4.2. Efecto del agregado de aceite esencial de *Lippia turbinata* (LT), *Tagetes minuta* (TM) y su uso rotativo (TM/LT) sobre la concentración de amoniaco (A) y el pH pre y post-alimentación (B y C) en el fluido ruminal. Días -2, -1 y 0 corresponden al período de adaptación; los AE fueron suministrados diariamente desde el final del día 0. Las barras representan el error estándar de la media. \* Diferencia estadísticamente significativa en comparación al control (DGC;  $P$ -valor < 0,05).

## DISCUSIÓN

Para que un AE se aplique a futuro como aditivo en la dieta de rumiantes y constituya una estrategia de mitigación del metano entérico, se debe garantizar que su efecto perdure en el tiempo. La adición de AE de *L. turbinata* (LT) y *T. minuta* (TM) a un sistema Rusitec que contenía FR de oveja resultó en un 90% de inhibición de la producción de metano durante un período de evaluación de 12 días, con solo reducciones menores de la producción de gas total, de la digestibilidad aparente de la MS y de la digestibilidad de la fibra. Estos resultados confirman el potencial de los AE de estas dos plantas nativas de Argentina para modificar selectivamente la actividad microbiana ruminal e disminuir la producción de metano. Sin embargo, la hipótesis de que el uso alternando de más de un AE con composición química diferente extendería la duración de la efectividad de los tratamientos no pudo ser confirmada, debido a que no se observó adaptación con el agregado individual de los AE durante el período que duró el experimento.

La inhibición de la producción de metano se produjo inmediatamente después de agregar los AE de *L. turbinata* y *T. minuta*, y se mantuvo durante el período experimental. Se ha reportado que los microorganismos ruminales pueden desarrollar tolerancia a los aditivos (Hook *et al.*, 2010), por lo que en este experimento propuso el uso rotativo de ambos AE en el tiempo. No se observó adaptación (pérdida de efectividad) en el tiempo, por lo que el tratamiento combinado de TM/LT no aportó mejores resultados en comparación a la incorporación de los AE individualmente. La ausencia de adaptación en el presente estudio se puede atribuir a la duración del experimento y/o a la dosis utilizada. El período experimental puede no haber sido lo suficientemente largo como para evaluar la habilidad de la microbiota ruminal para adaptarse al agregado de los AE individualmente. Por otro lado, la dosis utilizada en este experimento fue mayor (300 µl/l, aproximadamente 270 mg/l) a la reportada previamente por Cardozo *et al.* (2004) (0,22 mg/l) quienes observaron una pérdida de efectividad luego de seis días de adición de AE y extractos provenientes de *Allium sativa* (0,7% allicin), *Cinnamomum cassia* (59% cinamaldehído), *Pimpinella anisum* (86% anetol), *Origanum vulgare* (64% carvacrol y 16% timol), y

*Capsicum annuum* (12% capsaicina). En un trabajo posterior del mismo grupo (Busquet *et al.*, 2005) tampoco observaron adaptación con el agregado de AE de *A. sativa* y el compuesto puro cinamaldehído adicionados a una dosis de 31,2 y 312 mg/l. Cuando la dosis es elevada el efecto de los AE parece mantenerse en el tiempo en ensayos con cultivos continuos (Fraser *et al.*, 2007).

Cabe destacar que se observó en el control un aumento en la producción y concentración de metano hasta tres días luego del fin del período de adaptación. Esto podría estar indicando que el sistema no estaba completamente estabilizado al iniciar los tratamientos. Sin embargo, esto difícilmente haya influenciado los resultados de este estudio dado que el efecto de los tratamientos fue severo y de rápida acción. De hecho, es posible que el efecto de la adición de los AE hubiese sido aún más marcado si su incorporación hubiese comenzado el día 3 del período de tratamientos.

Se ha reportado que la diversidad microbiana en los fermentadores de cultivos continuos puede perderse a través del tiempo (Johnson *et al.*, 2009). Sin embargo, existe evidencia de que la comunidad microbiana del rumen en sistemas *in vitro* refleja bien la fermentación *in vivo*, a pesar de esta pérdida de diversidad microbiana (Weimer *et al.*, 2011; Weimer, 2015). En el presente ensayo, la degradación del sustrato y los productos de fermentación *in vitro* reflejan una fermentación “normal” en el tratamiento control. Por otro lado, esta menor diversidad teórica de la comunidad microbiana (metanogénicas) puede provocar también menor resiliencia ante alteraciones. Una hipótesis es que el efecto de los AE sobre los microorganismos metanogénicos fue de tal magnitud que su población y/o actividad fueron severamente reducidas, con pequeñas posibilidades de recuperarse en este tipo de sistemas *in vitro* donde no hay un nuevo aporte de masa microbiana ruminal, lo que representa una limitante en este tipo de ensayos. Sin embargo, como las poblaciones microbianas no fueron evaluadas en el presente estudio, no es posible arribar a una conclusión definitiva sobre el mecanismo detrás de la reducción de la producción de metano y su relación con la microbiota.



La inhibición de la producción de metano estuvo acompañada por una reducción de la producción de gas diaria solo en el primer día de adición de los AE, y luego retornó a valores similares a los del control (Figura 4.1B). Esto probablemente indique que algunas poblaciones microbianas puedan de hecho haberse adaptado a la presencia de los AE, mientras que los microorganismos metanogénicos no hayan logrado adaptarse (ya que la inhibición del metano se mantuvo en el tiempo).

Se observó un 5% de reducción de la digestibilidad aparente de la MS, mientras que la disminución fue mayor en la digestibilidad de la fibra (alrededor de un 15%). Como se mencionó anteriormente, una explicación sería que las bacterias celulolíticas son más sensibles a los AE y sus componentes que otros microorganismos del rumen (Patra y Yu, 2012, 2015; Cobellis *et al.*, 2016a). La reducción de la digestibilidad de la fibra puede también explicar en parte la inhibición de la producción de metano, pero no en su totalidad ya que la magnitud de la reducción fue seis veces mayor para el metano que para la fibra (90 y 15%, respectivamente).

Solo TM y TM/LT redujeron la concentración de amoníaco. Dado que en LT no se observaron efectos sobre el amoníaco, es probable que el efecto generado por el tratamiento rotativo de TM/LT se haya debido a la presencia de TM más que a la combinación de ambos AE. A pesar de la reducción en la concentración de amoníaco generada por TM y TM/LT, no se observó efectos sobre la digestibilidad aparente de la PB. Para entender acabadamente los efectos sobre el metabolismo proteico, se debería haber tenido en cuenta también la proteólisis, la fermentación de los aminoácidos, así como la síntesis de proteína microbiana, que no fueron evaluados en el presente trabajo. McIntosh *et al.* (2003) propusieron que el principal efecto de los AE sobre el catabolismo proteico es sobre la deaminación de los aminoácidos. En su estudio con una mezcla de AE que contiene entre un 10 y 30% de compuestos fenólicos (Crina<sup>®</sup>, Rossi, 1994) encontraron una disminución significativa en la tasa de producción de amoníaco desde aminoácidos libres, pero sin efecto sobre la degradación de las proteínas. En cultivos puros, observaron que un grupo de especies bacterianas denominadas “híper productoras de amoníaco” (HAP, por sus siglas en inglés) fue severamente inhibido con esta misma mezcla de AE.

Resultados similares fueron reportados *in vivo* donde la adición de AE disminuyó tanto el número como la diversidad de las bacterias HAP en el rumen (McEwan *et al.*, 2002), lo que estuvo asociado a una disminución de la tasa de producción de amoníaco desde aminoácidos libres. Más aún, un 24% de inhibición de la actividad de deaminasas fue reportada *in vivo* cuando esta mezcla de AE se suplementó a ovejas (Newbold *et al.*, 2004).

Limoneno fue el principal componente identificado para *L. turbinata* (62%), y también estuvo presente en *T. minuta*, siendo el único componente en común entre ambos AE. El tratamiento de LT tuvo una dosis diaria de limoneno de 186 µl/l, en TM/LT la dosis diaria promedió 102 µl/l, mientras que en TM la dosis fue de 18 µl/l. Castillejos *et al.* (2006) reportaron una reducción en la concentración de amoníaco solo a 500 mg/l, una dosis casi tres veces mayor que la evaluada en el presente estudio. Esto puede explicar por qué el tratamiento de LT no tuvo efecto sobre la concentración de amoníaco, mientras que en la combinación de TM/LT otros componentes presentes en *T. minuta* deben haber sido los responsables de la reducción observada para la concentración de amoníaco. Carvona fue el tercer componente presente en *L. turbinata* (6%), a este componente se le atribuye la actividad antimicrobiana del AE de *A. graveolens* (estandarizado a 47% de carvona). *A. graveolens* redujo la deaminación de aminoácidos *in vitro* (Macheboeuf *et al.*, 2008), y este efecto se observó con una dosis de 2,5 mM de carvona (equivalente a 376 mg/l). Esta dosis fue alrededor de 20 veces mayor a la utilizada para este compuesto, lo que también podría explicar la falta de efecto del tratamiento de LT en la concentración de amoníaco en el presente estudio.

La proporción molar de los AGV (excepto por valerato) fueron afectados por el tiempo de incubación; sin embargo, no se observaron efectos de los AE sobre la concentración y composición total de los AGV. En la síntesis de metano se remueven hidrógenos del rumen, previniendo la acumulación de co-factores reducidos (ej. NADH), mejorando la eficiencia de la digestión (McAllister *et al.*, 1996). Cuando la metanogénesis está inhibida, podría esperarse que el propionato aumente, ya que la síntesis de este AGV se ha descrito como una vía alternativa para la utilización de hidrógenos. Sin embargo,

Janssen (2010) propuso que esto no es estrictamente cierto; en su lugar, la formación de propionato es una alternativa a la formación de hidrógenos, dado que ambas vías metabólicas son aceptoras de electrones. Por lo tanto, la proporción de propionato no necesariamente cambiará cuando la producción de metano esté inhibida, como fue el caso del presente experimento. Ungerfeld (2015) hipotetizó que parte de los microorganismos productores de propionato no se adaptan bien a los cultivos continuos y que por lo tanto no se favorecen aun cuando las condiciones resulten termodinámicamente favorables para la producción de propionato, como ocurren cuando la metanogénesis está inhibida (Janssen, 2010). Por lo tanto, la ausencia de diferencias en la producción de propionato puede reflejar que la formación de hidrógenos no fue modificada, y que puede haberse dado una inhibición directa sobre los metanógenos. Esto habría generado aumentos en la concentración de hidrógeno, pero no fue medido en el presente estudio como para confirmar esta hipótesis.

Janssen (2010) también sugirió que otros depósitos alternativos de los excesos de hidrógeno para cuando la metanogénesis está inhibida podrían no ser tenidos en cuenta. Entre estos depósitos alternativos, la síntesis de productos como el valerato, caproato y el formato podrían ser considerados. En el presente estudio, se observó un incremento numérico ( $0,10 < P$ ) de valerato (36%) en LT, y de caproato (13%) para TM; mientras que la concentración de formato no fue determinada.

El efecto sobre pH podría ser explicado por la toxicidad de los AE reportada para las especies amilolíticas, lo que reduciría la tasa de degradación del almidón (McIntosh *et al.*, 2003). A pesar de que esto sugeriría un potencial beneficio de estos AE sobre el control del pH, los resultados de un experimento *in vitro*, en el que las condiciones de pH son controladas por el agregado de *buffer*, deberían interpretarse con cuidado.

A pesar de que no se pudo comprobar la hipótesis de que el uso rotativo de dos AE de distinta composición química podría prolongar los efectos antimetanogénicos de estos aditivos, los resultados obtenidos son alentadores para profundizar el estudio de los AE de

*L. turbinata* y *T. minuta* como modificadores de la fermentación ruminal para reducir la producción de metano entérico.

## CONCLUSIONES

En las condiciones en las que se realizó este trabajo, la adición de aceites esenciales de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* redujo casi diez veces la producción de metano *in vitro*, con mínimos efectos sobre la digestibilidad del sustrato. El aceite esencial de *T. minuta* resulta también efectivo para modificar el metabolismo del nitrógeno en el rumen, reflejado por la reducción en la concentración de amoníaco, pero esto necesita ser analizado con mayor detalle del que fue posible en el presente estudio.

En conclusión, dada la significativa y persistente capacidad antimetanogénica de ambos aceites esenciales y el potencial de *T. minuta* de modificar el metabolismo del nitrógeno, estas especies vegetales pueden ser consideradas como candidatas para el desarrollo de nuevos aditivos para manipular la actividad microbiana con potencial aplicación en la nutrición de rumiantes. Son críticamente importantes y necesarias las evaluaciones *in vivo* para confirmar la persistencia de los efectos de estos productos naturales para su potencial aplicabilidad como aditivos con el fin de mitigar la producción de metano.

### SÍNTESIS Y CONCLUSIONES GENERALES

En la actualidad hay un creciente interés por el estudio de aceites esenciales como aditivos en la dieta de rumiantes con el fin de modular la fermentación ruminal y reducir la metanogénesis (Benchaar y Greathead, 2011). El interés surge, por un lado, como una estrategia de mitigación de metano, ya que la fermentación de los alimentos en el rumen es señalada como una de las principales fuentes de este gas de efecto invernadero (Steinfeld *et al.*, 2006). Por otro, debido a la creciente preocupación por el posible desarrollo de resistencia de bacterias patógenas a los antibióticos, existe controversia respecto a su uso con fines nutricionales (Robinson *et al.*, 2017), lo que ha estimulado la búsqueda de alternativas naturales. La capacidad antimetanogénica de una serie de AE fue confirmada; sin embargo, hasta el presente trabajo, no se contaba con información de la bioactividad de AE de plantas de Argentina sobre la microbiota ruminal. El objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar el uso de algunos AE de plantas nativas de Argentina como aditivos para la alimentación de rumiantes con el fin de mitigar la producción de metano entérico.

En el Capítulo II se evaluaron los efectos de algunos AE de plantas de Argentina junto con otros provenientes de plantas de las que ya se disponía información en la bibliografía. De los diez AE evaluados, los efectos sobre la fermentación ruminal *in vitro* fueron distintos según el tipo de AE (especie vegetal) y la dosis. En todos los casos las mayores dosis de AE disminuyeron la producción de metano a expensas de una reducción de la digestibilidad de la fibra. La variabilidad de resultados entre AE se atribuyó a las diferencias en su composición química. Por otro lado, los efectos de los AE fueron distintos de los observados para la monensina (antibiótico usado como control positivo), sugiriendo que sus mecanismos de acción son diferentes. Como producto de esta etapa, se identificaron dos AE de plantas nativas, *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta*, con potencial para disminuir la producción de metano en fermentaciones ruminales *in vitro*.

El siguiente paso lógico fue evaluar la interacción de la adición de AE con el sustrato de fermentación. Para ello, se realizaron dos ensayos *in vitro* de fermentación corta en los que se evaluaron dosis crecientes de los dos AE seleccionados en la primer etapa, utilizando cinco sustratos de distinto valor nutricional. Como era de esperar, los efectos dependieron de la dosis y del sustrato; sin embargo, esta interacción fue distinta para el AE de *L. turbinata* y de *T. minuta*, lo que sugiere que sus mecanismos de acción difieren, asociado a las diferencias en la proporción de componentes oxigenados entre ambos AE. Una de las conclusiones de este capítulo fue que la efectividad de los AE para manipular la fermentación ruminal depende de interacciones entre las características del medio de incubación y la naturaleza química de los componentes del AE. Se sugirió que el pH podría ser una de las causas de la reactividad diferencial de los compuestos, condicionando su bioactividad. Probablemente existan, además, otros elementos del medio de incubación interactuen con los compuestos bioactivos de los AE, aumentando o disminuyendo su actividad. En el estudio de aceites esenciales en la fermentación ruminal es por lo tanto necesario conocer los componentes que los conforman, sus proporciones y las familias químicas a las que pertenecen, ya que esto condicionará las dosis a las que pueden ser efectivos y el sistema productivo donde tendrán mayor potencialidad de generar efectos positivos.

Uno de los desafíos que existe para la implementación de los AE como estrategia de mitigación de la producción de metano es garantizar que sus efectos perduren en el tiempo. El ensayo del Capítulo IV se diseñó para evaluar una alternativa para superar la potencial pérdida de efectividad del agregado de AE. La inhibición de la producción de metano se produjo inmediatamente después de agregar los AE de *L. turbinata* y *T. minuta* y no se observó adaptación a la adición de los AE individualmente. Por lo tanto, la hipótesis de que el uso rotativo de AE de diferente composición química prolongaría el efecto de los AE sobre la fermentación ruminal no pudo ser confirmada. En este estudio *T. minuta* además disminuyó la concentración de amoníaco, lo que refuerza la conclusión de que su acción sobre la comunidad microbiana del rumen es diferente.

Queda abierto el interrogante de si la ausencia de adaptación se debió a la incapacidad de la comunidad metanogénica de adaptarse a la adición de los AE

seleccionados, o si se debió a las limitaciones experimentales con las que se realizó el ensayo (duración y tipo de sistema *in vitro*). La comunidad microbiana en el rumen es redundante, ya que entre las distintas especies existentes puede haber superposición de funciones; y es resiliente, es decir, tiene resistencia a los cambios y la capacidad de recuperarse luego de una perturbación (Weimer, 2015). Ambas propiedades proporcionan una notable estabilidad que mantiene la función digestiva para el animal en una variedad de condiciones de alimentación y manejo, pero también suponen un desafío para la implementación de estrategias para mejorar la fermentación en el rumen. Son críticamente importantes las evaluaciones *in vivo* para confirmar la capacidad de estos AE para reducir la producción de metano, a la vez que evaluar la persistencia de sus efectos.

En las Figuras 5.1 y 5.2 se presentan las reducciones relativas a los controles para la producción de metano y de la digestibilidad de la fibra en todas las dosis evaluadas en la presente tesis con los AE de *L. turbinata* y *T. minuta* respectivamente. Ambos AE disminuyeron la producción de metano *in vitro*, y la magnitud de la respuesta dependió de la dosis, del sustrato y de las condiciones experimentales (tipo de sistema *in vitro*). En dosis intermedias y elevadas, esta reducción estuvo asociada a una disminución de la digestibilidad de la fibra, lo cual es considerado un efecto negativo. El impacto negativo fue mayor en sistemas de fermentación corta que en el Rusitec, en el cual se observó que a pesar de que la digestibilidad disminuyó un 15%, no se detectaron efectos sobre la producción y composición de los AGV, que son la principal fuente de energía a partir de la fermentación ruminal para el animal. Por otro lado, se mencionó que parte de la reducción de metano se puede explicar por una menor digestibilidad de la fibra, pero no en su totalidad ya que, tomando como ejemplo los resultados del Rusitec, la magnitud de la reducción fue seis veces mayor para el metano que para la fibra.

Existen muchos aspectos de su uso y acción que permanecen aún desconocidos para garantizar que se constituyan en una estrategia de mitigación de la producción de metano en rumiantes. Aún no se conocen con exactitud los mecanismos por los que los AE ejercen su actividad antimicrobiana, pero se ha mencionado que la presencia de oxígeno en la estructura química es importante (Benchaar y Greathead, 2011). Los AE con elevadas



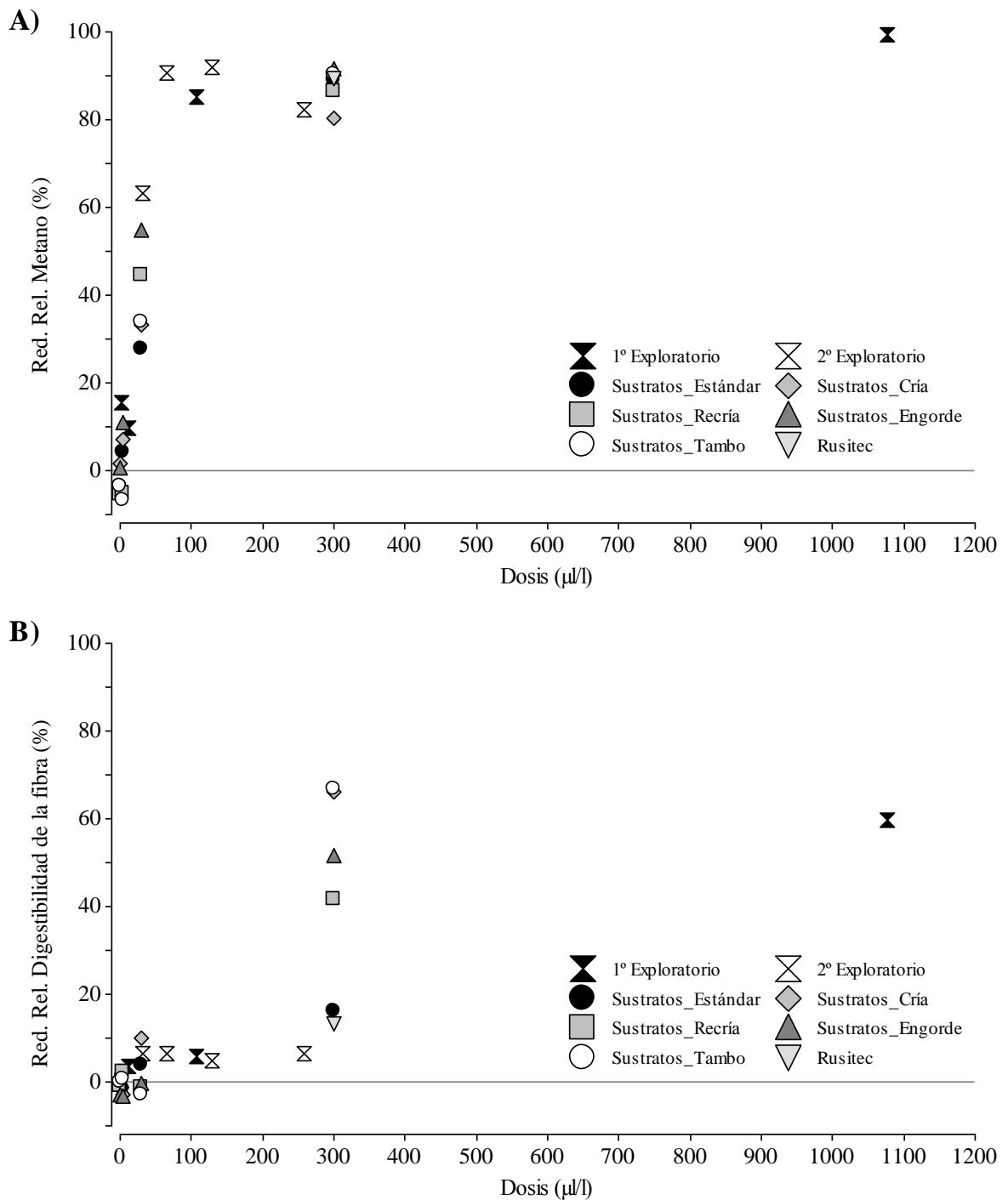


Fig. 5.1. Reducción relativa respecto al control (tratamiento sin AE) para: A) producción de metano y B) digestibilidad de la fibra en detergente neutro, para las dosis evaluadas en todos los ensayos *in vitro* realizados con el aceite esencial de *Lippia turbinata*. Las dosis de los ensayos exploratorios se expresó también en  $\mu\text{l/l}$  con una densidad medida de 0,929 g/l.

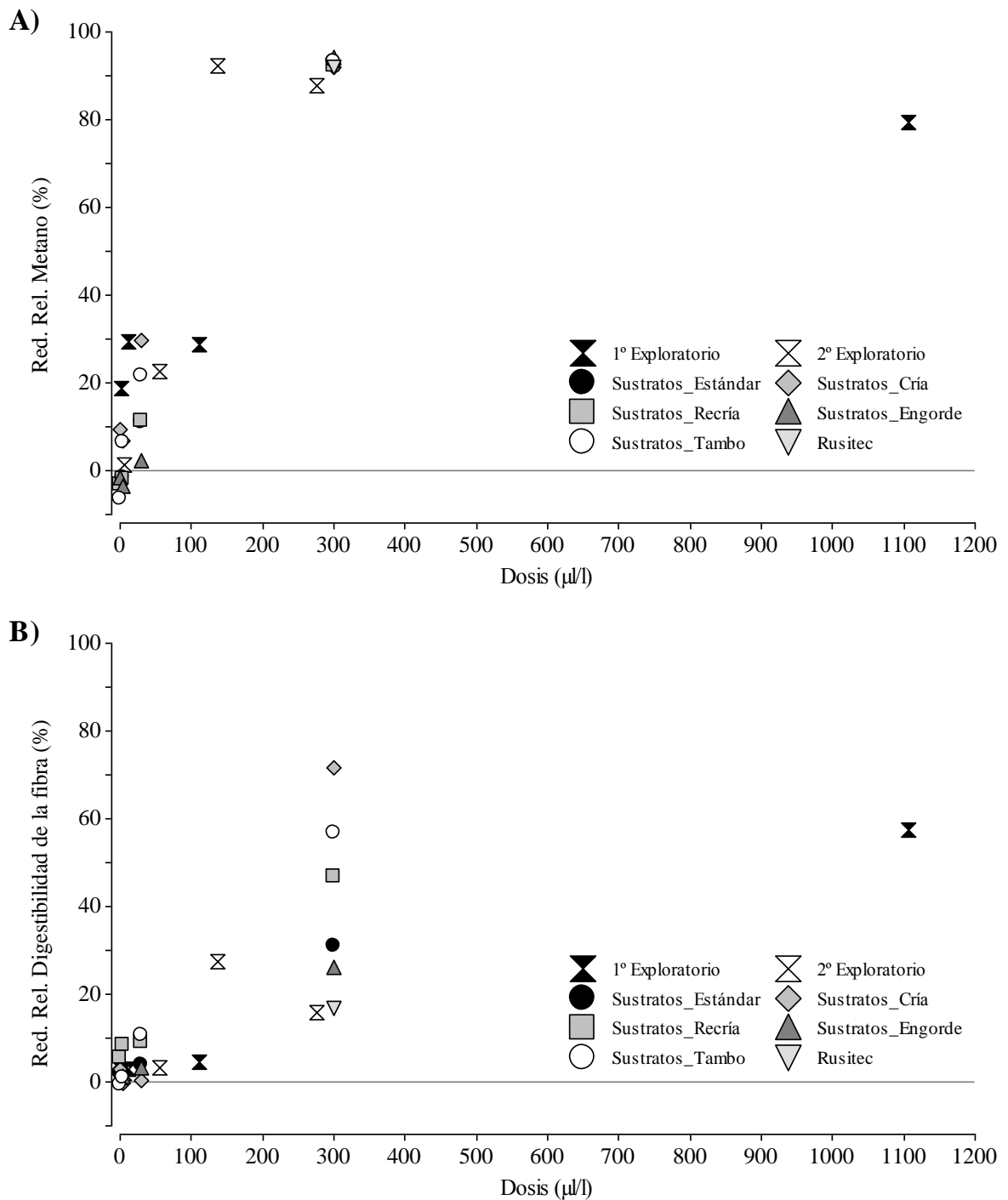


Fig. 5.2. Reducción relativa respecto al control (tratamiento sin AE) para: A) producción de metano y B) digestibilidad de la fibra en detergente neutro, para las dosis evaluadas en todos los ensayos *in vitro* realizados con el aceite esencial de *Tagetes minuta*. Las dosis de los ensayos exploratorios se expresó también en µl/l con una densidad medida de 0,904 g/l.

proporciones de hidrocarburos son considerados de menor actividad biológica que los compuestos oxigenados (Chalchat *et al.*, 1997; Cosentino *et al.*, 1999; Dorman y Deans, 2000). Esto indica una mayor bioactividad de *T. minuta*, lo que explica que se observe un menor margen entre dosis que generan efectos positivos (reducción de metano sin afectar digestibilidad) y negativos (reducción del aprovechamiento del sustrato). En contraste, en el AE de *L. turbinata*, con baja proporción de compuestos oxigenados, se alcanzaron dosis más elevadas antes de detectarse efectos negativos.

En el estudio del mecanismo de acción de inhibidores de la metanogénesis, toma relevancia evaluar la dinámica del hidrógeno en el rumen, el cual influencia la formación del metano y la actividad de otros microorganismos. El ambiente ruminal es un sistema extremadamente complejo en el cual el metano cumple el rol de evitar la acumulación de hidrógeno (McAllister *et al.*, 1996). En un ambiente donde la metanogénesis es inhibida, surge el interrogante de qué ocurre con el excedente de hidrógenos que no es utilizado para la síntesis de metano y cómo será la funcionalidad del rumen en esas condiciones. Resta evaluar el efecto de los AE de *L. turbinata* y *T. minuta* sobre la dinámica del hidrógeno en el rumen.

A pesar de que todos los sistemas *in vitro* son una reducción de la complejidad existente en el rumen, permiten evaluar un gran número de tratamientos simultáneamente y proveen información útil para explicar lo que ocurre en el rumen. Entre los sistemas de fermentación *in vitro* utilizados en el presente trabajo de tesis, la relación entre MS incubada y volumen de incubación difirió; en los *in vitro* de fermentación corta la relación fue de 1 g cada 100 ml de medio de incubación, mientras que en el Rusitec la relación fue de 1 g cada 40 ml. De esta manera, para trasladar la dosis entre un sistema y otro, no resulta lo mismo basar el cálculo en el sustrato (mg o  $\mu\text{l/g}$  MS) o en el volumen de incubación (mg o  $\mu\text{l/l}$ ). Así, la dosis de 300  $\mu\text{l/l}$  evaluada en los *in vitro* de fermentación corta y en el Rusitec, no resultó la misma expresada en base a la MS incubada, siendo de 30 y 12  $\mu\text{l/g}$  MS respectivamente.

Se ha señalado que del gran número de trabajos que evaluaron AE en ensayos de fermentación *in vitro*, solo unos pocos estudios confirmaron sus efectos *in vivo* (Cobellis *et al.*, 2016b). La dificultad de la determinación de la dosis correcta a evaluar *in vivo* desde los ensayos exploratorios *in vitro* puede ser una de las razones por la que no se reproducen los efectos positivos que se observaron previamente *in vitro*. Se deberá tomar especial consideración a las diferencias en la relación de MS respecto al volumen ruminal en el animal para extrapolar las dosis que se utilizan de referencia en base a los resultados obtenidos de experimentaciones *in vitro*.

Los efectos reportados en los estudios con AE como modificadores de la fermentación ruminal, tanto *in vitro* como *in vivo*, son inconsistentes y dispares. La escasa información sobre la fuente y la composición química de los AE usados en la mayoría de los estudios de fermentación ruminal dificultan la posibilidad de establecer una causa específica para la discrepancia entre resultados (Cobellis *et al.*, 2016a). Burt (2004) reportó que existen interacciones entre los componentes de los AE, que pueden ser de sinergismo o antagonismo, por lo que su bioactividad no se debe exclusivamente a la presencia de uno o dos componentes en mayor proporción. Para interpretar los mecanismos detrás de los efectos observados, resulta entonces crítico considerar la composición química en su totalidad, y no solo la proporción de los compuestos principales. Sin embargo, en general poco se discute o analiza sobre la composición química completa de los AE que se evalúan (Bodas *et al.*, 2012; Cobellis *et al.*, 2016a). En este sentido, el presente trabajo de tesis procuró asociar las diferencias observadas en los distintos AE evaluados en función de los componentes presentes y sus proporciones.

El fin último de este tipo de estudios en el que se parte de la identificación de compuestos bioactivos para modular la actividad en el rumen, es el posterior desarrollo de aditivos para modificar un proceso digestivo en particular. Hay que tener en cuenta que así como se modificó la actividad ruminal y disminuyó la producción de metano, se podrían alterar otros procesos que ocurren en el rumen. Esto podría tener connotaciones positivas, si se toma en cuenta la potencialidad de modular otros procesos y utilizar estos aceites esenciales con otros fines, como podrían ser modificar el perfil de ácidos grasos, o el

metabolismo de la proteína, o controlar la acidosis ruminal. Un ejemplo de esto sería la capacidad del aceite esencial de *T. minuta* de disminuir la concentración de amoníaco, lo que podría ser de interés en dietas de alto contenido proteico para disminuir las pérdidas de amoníaco por orina.

Opuesto a esto, se deberá evaluar si en paralelo a la disminución de la producción de metano estamos afectando otros procesos que no hayan sido abordados por el carácter exploratorio *in vitro* del presente trabajo y que podrían constituirse en una externalidad negativa. En este sentido, habrá que considerar que no generen toxicidad a otros microorganismos benéficos en el microbioma del rumen o del tracto digestivo posterior, que no impliquen toxicidad para el animal y que por disminuir este contaminante ambiental, no estemos simultáneamente aumentando otro. También habrá que evaluar la posible transferencia de los componentes de los aceites esenciales y/o de metabolitos derivados que puedan afectar la calidad química y/o sensorial de la carne o leche producida.

Para finalizar, el eje de la presente tesis fue la disminución de la producción de metano, y por lo tanto, las variables que se determinaron se focalizaron en ese sentido. Pero surge la pregunta, *¿cuál es el alcance del efecto de la incorporación de sustancias antimicrobianas – que actúan sobre hongos, bacterias, y hasta en insectos – en un ambiente que se basa en la funcionalidad de microorganismos, de los cuales sólo se ha descrito y conoce una pequeña porción de su comunidad?*

## CONCLUSIONES GENERALES

Los estudios realizados sobre los efectos de la adición de algunos aceites esenciales sobre la fermentación microbiana ruminal en sistemas *in vitro* en la presente tesis permiten concluir, bajo las condiciones experimentales utilizadas, que:

La acción de los aceites esenciales sobre la fermentación ruminal depende de su composición química, de la dosis y del medio de fermentación; y estos tres factores están interrelacionados. El rango de dosis en el que un aceite esencial es efectivo está asociado al nivel de bioactividad de los compuestos que lo conforman, los que a su vez, según el grupo funcional al que pertenecen, reaccionarán de manera distinta a las condiciones del medio. Se deberá profundizar en el entendimiento de cómo el ambiente de fermentación modifica las propiedades físicas y químicas de los compuestos de los aceites esenciales. Por otro lado, queda pendiente comprender cómo los aceites esenciales con distinta composición química modifican la estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana del rumen, y que podrían explicar en gran medida las diferencias observadas entre estudios.

Los aceites esenciales de *Lippia turbinata* y de *Tagetes minuta* son efectivos para reducir la producción de metano *in vitro*, con efectos mínimos o nulos sobre el aprovechamiento del sustrato a dosis adecuadas, la cual depende del sustrato y del sistema de fermentación *in vitro* (cerrado o continuo). Debido a las diferencias en los efectos observados y en su composición química, se concluye que actuarían sobre distintas poblaciones microbianas y que sus mecanismos de acción difieren. Varias incógnitas surgen a la hora de definir cómo avanzar hacia el próximo nivel en ensayos con animales; entre ellas, cómo suministrarlos y en qué dosis serán de las primeras a abordar.

Por todo lo expuesto, se concluye que los aceites esenciales de *Lippia turbinata* y *Tagetes minuta* pueden ser considerados como candidatos para el desarrollo de nuevos aditivos en la nutrición de rumiantes como estrategia para mitigar la producción de metano

entérico. Para su potencial aplicabilidad son críticamente necesarias las evaluaciones *in vivo* para optimizar la dosis según el sistema de producción en el que se vayan a aplicar, confirmar la persistencia de los efectos y evaluar la posible transferencia de componentes y/o metabolitos derivados que pueden afectar la calidad de la carne o leche producida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acamovic T. and Brooker J. D. 2005. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 64:403–412.
- Adams R. P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, Estados Unidos, 804 pp.
- Ando S., Nishida T., Ishida M., Hosoda K. and Bayaru E. 2003. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*. 82:245–248.
- AOCS. 1998. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. American Oil Chemist Society Champaign, Illinois, Estados Unidos.
- Araujo R. C., Pires A. V., Mourão G. B., Abdalla A. L. and Sallam S. M. A. 2011. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Animal Feed Science and Technology*. 166–167:155–162.
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46:446–475.
- Banik B. K., Durmic Z., Erskine W., Revell C. K., Vadhanabhuti J., McSweeney C. S., Padmanabha J., Flematti G. R., Algreiby A. A. and Vercoe P. E. 2016. Bioactive fractions from the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. have an anti-methanogenic effect against key rumen methanogens. *Anaerobe*. 39:173–182.
- Barbieri N., Costamagna M., Gilabert M., Perotti M., Schuff C., Isla M. I. and Benavente A. 2016. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province. *Pharmaceutical Biology*. 54:168–173.
- Beauchemin K. A., Kreuzer M., O'Mara F. and McAllister T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48:21–27.
- Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A. V., Fraser G. R., Colombatto D., McAllister T. A. and Beauchemin K. A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*. 145:209–228.
- Benchaar C. and Greathead H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 166–167:338–355.
- Bergmeyer H. U. and Beutler H. O. 1985. Ammonia. *Methods of enzymatic analysis*. Volume 8. Academic Press. Nueva York, Estados Unidos. pp. 454–461.
- Bodas R., Prieto N., García-González R., Andrés S., Giráldez F. J. J. and López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*. 176:78–93.
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94:223–253.
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A., Cardozo P. W. and Kamel C. 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 88:2508–2516.
- Busquet M., Calsamiglia S., Ferret A. and Kamel C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*. 89:761–771.
- Calsamiglia S., Busquet M., Cardozo P. W., Castillejos L. and Ferret A. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of*



- Dairy Science. 90:2580–2595.
- Camiletti B. X., Asensio C. M., Gadban L. C., Giménez Pecci M. de la P., Conles M. Y. and Lucini E. I. 2016. Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against the rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Industrial Crops and Products*. 85:117–124.
- Cardozo P. W., Calsamiglia S., Ferret A. and Kamel C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*. 82:3230–3236.
- Cardozo P. W., Calsamiglia S., Ferret A. and Kamel C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*. 83:2572–2579.
- Castillejos L. 2005. Modificación de la fermentación microbiana ruminal mediante compuestos de aceites esenciales. Tesis doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, España, 164 pp.
- Castillejos L., Calsamiglia S. and Ferret A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. *Journal of Dairy Science*. 89:2649–2658.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Ferret A. and Losa R. 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 132:186–201.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Martín-Tereso J. and Ter Wijlen H. 2008. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*. 145:259–270.
- Cattani M., Maccarana L., Rossi G., Tagliapietra F., Schiavon S. and Bailoni L. 2016. Dose-response and inclusion effects of pure natural extracts and synthetic compounds on *in vitro* methane production. *Animal Feed Science and Technology*. 218:100–109.
- Chalchat J. -C., Garry R. -P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. 1997. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some african essential oils. *Journal of Essential Oil Research*. 9:67–75.
- Chamorro E. R., Ballerini G., Sequeira A. F., Velasco G. A. and Zalazar M. F. 2008. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. leaves and flowers. *Journal of the Argentine Chemical Society*. 96:80–86.
- Chaves A. V., He M. L., Yang W. Z., Hristov A. N., McAllister T. A. and Benchaar C. 2008. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. *Canadian Journal of Animal Science*. 88:117–122.
- Chizzola R., Hochsteiner W. and Hajek S. 2004. GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twigs in the Rusitec system. *Veterinary Science*. 76:77–82.
- Cobellis G., Trabalza-Marinucci M., Marcotullio M. C. and Yu Z. 2016a. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 215:25–36.
- Cobellis G., Trabalza-Marinucci M. and Yu Z. 2016b. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total*

- Environment. 545–546:556–568.
- Cosentino S., Tuberoso C. I. G., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E. and Palmas F. 1999. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29:130–135.
- Czerkawski J. W. and Breckenridge G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *The British Journal of Nutrition*. 38:371–384.
- Dellacasa A. D., Bailac P. N., Ponzi M. I., Ruffinengo S. R. and Eguaras M. J. 2003. *In vitro* activity of essential oils from San Luis-Argentina against *Ascosphaera apis*. *Journal of Essential Oil Research*. 15: 282–285.
- Dewick P. M. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Pharmaceutical Sciences. John Wiley & Sons, Ltd. West Sussex, Inglaterra, 514 pp.
- Di Rienzo J. A., Guzman A. W. and Casanoves F. 2002. A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*. 7:129–142.
- División de Población de las Naciones Unidas. 2017. Datos sobre expectativas de crecimiento de la población. Publicado en internet, disponible en <http://www.un.org/es/sections/issues-depth/population/index.html>. Activo en diciembre 2017.
- Dorman H. J. D. and Deans S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88:308–316.
- Duschatzky C. B., Martinez A. N., Almeida N. V. and Bonivardo S. L. 2004. Nematicidal activity of the essential oils of several Argentina plants against the root-knot nematode. *Journal of Essential Oil Research*. 16:626–628.
- Evans J. D. and Martin S. A. 2000. Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*. 41:336–340.
- FAO. 2012. *Ganadería mundial 2011 – La ganadería en la seguridad alimentaria*. FAO – Roma, Italia.
- Fraser G. R., Chaves A. V., Wang Y., McAllister T. A., Beauchemin K. A. and Benchaar C. 2007. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *Journal of Dairy Science*. 90:2315–2328.
- Fuselli S. R., García de la Rosa S., Gende L. B., Eguaras M. J. and Fritz R. 2006. Antimicrobial activity of some Argentinean wild plant essential oils against *Paenibacillus larvae larvae*, causal agent of American foulbrood (AFB). *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 45:2–7.
- García C. C., Talarico L., Almeida N., Colombres S., Duschatzky C. and Damonte E. B. 2003. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. *Phytotherapy Research*. 17:1073–1085.
- García F., Martínez Ferrer J., Durmic Z. and Vercoe P. E. 2015. Effect of ethanol as carrier of essential oils on *in vitro* methane production. *Actas de la XXIV Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal*. p. 518.
- García M. V., Matias J., Cavalcante Barros J. C., Pries de Lima D., da Silva Lopes R. and Andreotti R. 2012. Chemical identification of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 21:405–411.
- Gerber P. J., Hristov A. N., Henderson B., Makkar H., Oh J., Lee C., Meinen R., Montes

- F., Ott T., Firkins J., Rotz A., Dell C., Adesogan A. T., Yang W. Z., Tricarico J. M., Kebreab E., Waghorn G., Dijkstra J. and Oosting S. 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: A review. *Animal*. 7:220–234.
- Goering H. K. and Van Soest P. J. 1970. Forage Fiber Analysis: Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications. Agriculture. Handbook n° 379. U.S.D.A. Agricultural Research Service. Washington DC, Estados Unidos, 20 pp.
- Helander I. M., Alakomi H. -L., Latva-Kala K., Mattila-Sandholm T., Pol I., Smid E. J., Gorris L. G. M. and von Wright A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46:3590–3595.
- Henderson G., Cox F., Ganesh S., Jonker A., Young W., Global Rumen Census Collaborators and Janssen P. H. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Scientific Reports* 5:14567.
- Héthélyi E., Dános B. and Tétényi P. 1986. GC-MS Analysis of the essential oils of four *Tagetes* species and the anti-microbial activity of *Tagetes minuta*. *Flavour and Fragrance Journal*. 1:169–173.
- Hili P., Evans C. S. and Veness R. G. 1997. Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*. 24:269–275.
- Hook S. E., Wright A-D. G. and McBride B. W. 2010. Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. Article ID 945785, 11 pp.
- Hristov A. N., Oh J., Firkins J. L., Dijkstra J., Kebreab E., Waghorn G., Makkar H. P. S., Adesogan A. T., Yang W., Lee C., Gerber P. J., Henderson B. and Tricarico J. M. 2013. SPECIAL TOPICS-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*. 91:5045–5069.
- Hristov A. N., Ropp J. K., Zaman S. and Melgar A. 2008. Effects of essential oils on *in vitro* ruminal fermentation and ammonia release. *Animal Feed Science and Technology*. 144:55–64.
- InfoStat. Versión 2016. Grupo Infostat/FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Ed. Brujas, Córdoba, Argentina.
- IPCC 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, Estados Unidos. 1535 pp.
- Janssen P. H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Science and Technology*. 160:1–22.
- Jaurena G., Cantet J. M., Colombatto D. y Arroquy J. I. 2014. Nutrición de rumiantes y emisiones de metano. En: Suelos, producción agropecuaria y cambio climático: Avances en la Argentina. Medina C. P., Zubillaga M. M. y Taboada M. Á. (Eds.) Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Buenos Aires, Argentina, pp. 225–238.
- Jeyanathan J., Martin C. and Morgavi D. P. 2014. The use of direct-fed microbials for mitigation of ruminant methane emissions: a review. *Animal*. 8:250–261.
- Joch M., Cermak L., Hakl J., Hucko B., Duskova D. and Marounek M. 2016. *In vitro*

- screening of essential oil active compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 29:952–959.
- Johnson M. C., Devine A. A., Ellis J. C., Grunden A. M. and Fellner V. 2009. Effects of antibiotics and oil on microbial profiles and fermentation in mixed cultures of ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science*. 92:4467–4480.
- Jouany J.-P. and Morgavi D. P. 2007. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*. 1:1443–1466.
- Juliani H. R., Koroch A., Simon J. E., Biurrun F. N., Castellano V. and Zygadlo J. A. 2004. Essential oils from Argentinean aromatic plants. *Acta Horticulturae*. 629:491–498.
- Khiaosa-ard R. and Zebeli Q. 2013. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *Journal of Animal Science*. 91:1819–1830.
- Klevenhusen F., Muro-Reyes A., Khiaosa-ard R., Metzler-Zebeli B. U. and Zebeli Q. 2012. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on *in vitro* ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 176:61–69.
- Kouazounde J. B., Jin L., Assogba F. M., Ayedoun M. A., Wang Y., Beauchemin K. A., McAllister T. A. and Gbenou J. D. 2015. Effects of essential oils from medicinal plants acclimated to Benin on *in vitro* ruminal fermentation of *Andropogon gayanus* grass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95:1031–1038.
- Łowicki D. and Huczyński A. 2013. Structure and antimicrobial properties of monensin A and its derivatives: Summary of the achievements. *BioMed Research International*. 2013:1–14.
- Macheboeuf D., Morgavi D. P., Papon Y., Mousset J. -L. and Arturo-Schaan M. 2008. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*. 145:335–350.
- Martínez M. E., Ranilla M. J., Ramos S., Tejido M. L. and Carro M. D. 2011. Evolution of fermentation parameters in Rusitec fermenters operated at different dilution rates and concentrate retention times. Challenging strategies to promote the sheep and goat sector in the current global context. Zaragoza: CIHEAM / CSIC / Universidad de León, España/FAO, pp.121–126.
- Mateos I., Ranilla M. J., Tejido M. L., Saro C., Kamel C. and Carro M. D. 2013. The influence of diet type (dairy versus intensive fattening) on the effectiveness of garlic oil and cinnamaldehyde to manipulate *in vitro* ruminal fermentation and methane production. *Animal Production Science*. 53:299–307.
- McAllister T. A. and Newbold C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48:7–13.
- McAllister T. A., Okine E. K., Mathison G. W. and Cheng K. -J. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76:231–243.
- McDougall E. I. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep’s saliva. *Biochemical Journal*. 43:99–109.
- McEwan N. R., Grahama R. C., Wallace R. J., Losa R., Williams P. and Newbold C. J. 2002. Effect of essential oils on ammonia production by rumen microbes. *Proceedings of Reproduction Nutrition Development*. p.65.
- McIntosh F. M., Williams P., Losa R., Wallace R. J., Beaver D. A. and Newbold C. J.

2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:5011–5014.
- Molero R., Ibars M., Calsamiglia S., Ferret A. and Losa R. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology*. 114:91–104.
- Moumen A., Azizi G., Chekroun K. Ben and Mourad B. 2016. The effects of livestock methane emission on the global warming: a review. *International Journal of Global Warming*. 9:229–253.
- Newbold C. J., McIntosh F. M., Williams P., Losa R. and Wallace R. J. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 114:105–112.
- Opio C., Gerber P., Mottet A., Falculli A., Tempio G., MacLeod M., Vellinga T., Henderson B. and Steinfeld H. 2013. Greenhouse gas emissions from ruminant supply chains - A global life cycle assessment. FAO. Roma, Italia, 214 pp.
- Palacios S. M., Bertoni A., Rossi Y., Santander R. and Urzúa A. 2009. Insecticidal activity of essential oils from native medicinal plants of Central Argentina against the house fly, *Musca domestica*. *Parasitology Research*. 106:207–212.
- Patra A. K. and 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*. 78:4271–4280.
- Patra A. K. and Yu Z. 2015. Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. *Frontiers in Microbiology*. 6:1–13.
- Pérez-Zamora C. M., Torres C., Aguado M. I., Bela A. J., Nuñez M. B. and Bregni C. 2016. Antibacterial activity of essential oils of *Aloysia polystachya* and *Lippia turbinata* (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 15:199–205.
- Pinski B., Günal M. and AbuGhazaleh A. A. 2015. The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. *Animal Production Science*. 56:1707–1713.
- Quiroga P. R., Grosso N. R., Lante A., Lomolino G., Zygadlo J. A. and Nepote V. 2012. Chemical composition, antioxidant activity and anti-lipase activity of *Origanum vulgare* and *Lippia turbinata* essential oils. *International Journal of Food Science and Technology*. 48:642–649.
- Ranga Niroshan Appuhamy J. A. D., Strathe A. B., Jayasundara S., Wagner-Riddle C., Dijkstra J., France J. and Kebreab E. 2013. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*. 96:5161–5173.
- Ribeiro Pereira L. G., Machado F. S., Campos M. M., Júnior G., Tomich R., Reis L. G. and Coombs C. 2015. Enteric methane mitigation strategies in ruminants: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 28:124–143.
- Robinson T. P., Bu D. P., Carrique-Mas J., Fèvre E. M., Gilbert M., Grace D., Hay S. I., Jiwakanon J., Kakkar M., Kariuki S., Laxminarayan R., Lubroth J., Magnusson U., Thi Ngoc P., Van Boeckel T. P. and Woolhouse M. E. J. 2017. Antibiotic resistance: mitigation opportunities in livestock sector development. *Animal*. 11:1–3.
- Rossi J. 1994. Composition pour améliorer la digestibilité des aliments destinés aux animaux ruminants. Patente.

- Russell J. B. and Strobel H. J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:1–6.
- Senatore F., Napolitano F., Mohamed M. A-H., Harris P. J. C., Mnkeni P. N. S. and Henderson J. 2004. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. *Flavour and Fragrance Journal*. 19:574–578.
- Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales M. and De Haan C. 2006. *Livestock's long shadow: Environmental issues and options*. FAO, Roma, Italia, 377 pp.
- Terblanché F. C. and Kornelius G. 1996. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) - A literature review. *Journal of Essential Oil Research*. 8:471–485.
- Tercer Comunicación Nacional de la República Argentina a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático. 2015. Secretaría de Agricultura, Ganadería, y Cambio de Uso del Suelo y Silvicultura, Argentina, 282 pp.
- Tereschuk M. L., Riera M. V. Q., Castro G. R. and Abdala L. R. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*. 56:227–232.
- Theodorou M. K., Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B. and France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*. 48:185–197.
- Tilley J. M. A. and Terry R. A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass and Forage Science*. 18:104–111.
- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G. and Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:2474–2478.
- Ungerfeld E. M. 2015. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: A meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*. 6: 1–17.
- Van Nevel C. J. and Demeyer D. I. 1977. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology*. 34:251–257.
- Van Soest P. J., Robertson J. B. and Lewis B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583–3597.
- Weimer P. J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Frontiers in Microbiology*. 6:1–16.
- Weimer P. J., Stevenson D. M., Mertens D. R. and Hall M. B. 2011. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during *in vitro* ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes. *Animal Feed Science and Technology*. 169:68–78.
- Yang W. Z., Benchaar C., Ametaj B. N., Chaves A. V., He M. L. and McAllister, T. A. 2007. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 90:5671–5681.
- Zygadlo J. A. and Juliani H. R. 2003. Study of essential oil composition of aromatic plants from Argentina. En: *Recent progress in medicinal plants: Phytochemistry & Pharmacology II*, Vol. 8. Majumdar D. K., Govil J. N. and Singh V. K. (ed.) Texas, Estados Unidos, pp. 273–291.

## **ANEXO 1**

### **COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES EVALUADOS EN LA ETAPA EXPLORATORIA**

Tabla 1. Concentración de compuestos detectados (porcentaje relativo) en los diez aceites esenciales evaluados.

Componente	Fórmula química	AG	EG	LT	MxP	OVc	OVm	RO	SM	TM	TV
Alcohol											
Borneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	1,5
τ Cadinol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	4,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis</i> Carveol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	2,1	-	-	-	-	-	-	-
Elemol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	10,9	-	-
β Eudesmol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	3,6	-	-
γ Eudesmol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	2,6	-	-
Dehidroxy-isocalamendiol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	18,9	-	-
Germacreno-4-ol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-
Isoborneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-
Linalol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	3,4	-	-	-	-	-	2,0	-	1,4	4,0
Mentol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	-	-	-	51,7	-	-	-	-	-	-
Mirtenol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
τ Muurolol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-
Neoisomentol	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-
<i>trans</i> Pinocarveol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	5,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>cis</i> Piperitol	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
Spatulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	13,8	-	-	-	0,2	-	-	-	4,6	-
Terpinen-4-ol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	6,2	-	-	6,0	5,6	2,2	-	-	1,7
α Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	5,8	3,8	-	-	1,9	3,4	-	-	-



Tabla 1. Concentración de compuestos detectados (porcentaje relativo) en los diez aceites esenciales evaluados.

**Continuación.**

Componente	Fórmula química	AG	EG	LT	MxP	OVc	OVm	RO	SM	TM	TV
$\beta$ Terpineol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
<i>cis</i> Verbenol	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceto-alcohol											
Cinerolona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>			3,2							
Cetona											
Camfor	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	-	14,2	-	-	-
Crisantenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	7,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carvona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	-	6,0	1,4	-	-	-	-	-	-
Isopinocanfona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	1,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mentona	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	-	24,2	-	-	-	-	-	-
Pinocanfona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-
Pinocarvona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	1,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Piperitenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	4,6	-
<i>cis</i> Tagetona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	27,9	-
<i>trans</i> Tagetona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	5,9	-
Verbenona	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	-	-	-	-	-	3,4	-	42,2	-
Epóxido											
Óxido de cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	8,5	-	2,7	-	-	-	-	-	-	0,9
Óxido de pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	2,3	-
Óxido de piperitenona	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	-	-	3,2	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 1. Concentración de compuestos detectados (porcentaje relativo) en los diez aceites esenciales evaluados.

**Continuación.**

Componente	Fórmula química	AG	EG	LT	MxP	OVc	OVm	RO	SM	TM	TV
<b>Éster</b>											
Acetato de bornilo	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	-	-	8,4	-	-	-	0,6	-	-	-
Acetato de mentol	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-
Acetato octen-3-ilo	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	2,2
Acetato de terpinilo	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	-	8,0	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Éter</b>											
Eucaliptol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	12,8	76,6	-	5,6	-	-	24,7	-	-	2,1
<b>Éter-fenólico</b>											
Anetol	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	2,4	-	-
Carvacrol metil éter	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	3,4	1,1	-	-	-	-
Timol metil éter	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
<b>Fenol</b>											
Carvacrol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	-	-	-	-	4,0	3,2	-	-	5,7
Timol	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	-	-	-	26,7	17,8	-	-	-	28,8
<b>Furano</b>											
Mentofurano	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	-	-	-	7,3	-	-	-	-	-	-
<b>Hidrocarburo</b>											
β Cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8
δ Cadineno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,7	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-
Camfeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	3,3	-	-	-	2,6	8,2	-	0,8

Tabla 1. Concentración de compuestos detectados (porcentaje relativo) en los diez aceites esenciales evaluados.

**Continuación.**

Componente	Fórmula química	AG	EG	LT	MxP	OVc	OVm	RO	SM	TM	TV
$\alpha$ Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,9	-	-	1,1	-	0,6	1,5	-	-	-
$\beta$ Cariofileno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	5,4	-	3,0	-	-	1,5	3,9	0,8	-	2,8
$\alpha$ Copaeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
m-Cymeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-
o-Cymeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-
p-Cymeno	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	-	-	-	-	3,3	1,3	-	-	-	23,3
$\beta$ Elemeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-
Elixeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-
$\alpha$ Felandreno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	2,0	0,4	-	14,4	-	-
Germacreno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	-	-	-	1,0	1,1	1,4	-	2,3	-	-
$\gamma$ Gurjuneno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	3,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Limoneno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1,5	-	62,1	1,0	1,7	5,6	-	13,8	6,0	-
$\beta$ Myrceno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	2,8	2,0	20,5	1,0	-	2,3
$\beta$ <i>cis</i> Ocimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	-	0,9	-	-	-	-
$\beta$ <i>trans</i> Ocimeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	5,1	-
$\alpha$ Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	6,7	3,3	-	-	-	0,5	5,7	5,1	-	1,5
$\beta$ Pineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	4,7	-	-	0,6	-	-	0,8	3,8	-	-
Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	5,5	-	2,2	-	-	-	-	1,3	-	-
$\alpha$ Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	5,0	4,7	2,4	-	-	2,8
$\beta$ Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	0,9	-	-	-	-	-	-

Tabla 1. Concentración de compuestos detectados (porcentaje relativo) en los diez aceites esenciales evaluados.

**Continuación.**

Componente	Fórmula química	AG	EG	LT	MxP	OVc	OVm	RO	SM	TM	TV
$\gamma$ Terpineno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	12,4	6,4	1,8	-	-	16,7
Terpinoleno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-
Triciclono	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-
$\alpha$ Tujeno	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	1,3
Ylangeno	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidróxido											
<i>cis</i> hidro Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	-	-	2,1	3,5	-	-	-	-
<i>trans</i> hidro Sabineno	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	-	-	-	-	33,1	37,7	-	-	-	-

AG: *Aloysia gratissima*; EG: *Eucalyptus globulus*; LT: *Lippia turbinata*; MxP: *Mentha × piperita* var. *vulgaris*; OVc: *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* ec. Compacto; OVm: *O. vulgare* ssp. *hirtum* ec. Mendocino; RO: *Rosmarinus officinalis*; SM: *Schinus molle*; TM: *Tagetes minuta*; TV: *Thymus vulgaris*.