

Evaluación de la inclusión de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en dietas para rumiantes como aditivo sobre la digestibilidad.

JOSÉ ALEJANDRO RUEDA CAMERO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Médico Veterinario y Zootecnista.

Director

JUAN CARLOS HENAO ZAMBRANO,

Msc Ciencia Animal

**UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
IBAGUÉ
2019**



Esta obra está bajo una [licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento a los profesores de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Ibagué por las bases académicas y humanas enseñadas en el transcurso de la carrera para ser un buen profesional.

A los profesores Juan Carlos Henao Zambrano y Olga Teresa Barreto por ser un guía fundamental en la construcción de este proyecto con el aporte de sus conocimientos para la construcción del documento y la obtención de datos. De la misma manera agradecer al grupo de investigación dirigido por ellos rumescience y a los estudiantes que hacen parte de él por su apoyo en la realización de algunas actividades de campo.

A mis padres por la formación moral y ética que me han inculcado para ser una persona de bien para la sociedad y por su apoyo incondicional para lograr el sueño de estudiar Medicina Veterinaria y Zootecnia.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	5
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	9
4. OBJETIVO GENERAL	11
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	12
5.1 Aceites esenciales	12
5.2 Componentes de los aceites esenciales	12
5.3 Mecanismo de acción de los aceites esenciales	12
5.4 Efecto de los aceites esenciales sobre la digestibilidad.	14
5.5 Importancia de los aceites esenciales	14
5.6 Aceite esencial de ajo (<i>Allium sativum</i>)	15
5.7 Aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Animales y dieta.....	17
6.2 Digestibilidad y diseño	18
6.4 Análisis proximal	19
7. RESULTADOS.....	21
8. DISCUSIÓN	23
9. CONCLUSIONES	26
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la ración total mezclada y composición porcentual de los ingredientes utilizados en la dieta basal.....	17
Tabla 2. Cuadrado latino Crossover para evaluar digestibilidad in vivo de dietas con niveles de inclusión de aceite esencial de ajo (<i>Allium sativum</i>) y orégano (<i>Origanum vulgare</i>) en ovinos africanos de pelo corto.	18
Tabla 3. Consumo en ovinos africanos de pelo corto suplementados con diferentes niveles de aceite esencial de Ajo (<i>Allium sativum</i>) y Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).	21
Tabla 4. Digestibilidad aparente total en ovinos africanos de pelo corto suplementados con diferentes niveles de aceite esencial de ajo (<i>Allium sativum</i>) y orégano (<i>Origanum vulgare</i>).	22

1. RESUMEN

Los aceites esenciales son una alternativa para sustituir el uso de aditivos antibióticos en dietas para rumiantes por su efecto sobre la fermentación ruminal, mejorando la digestibilidad y disminuyendo pérdidas energéticas en forma de metano. El objetivo del presente estudio fue evaluar la inclusión de una mezcla de aceites esenciales (AE) de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en partes iguales sobre la digestibilidad *in vivo* en ovinos de carne. Fueron utilizados doce ovinos africanos de pelo corto machos enteros, los cuales fueron distribuidos en un diseño de cuadrado latino 4X4 con cuatro tratamientos: 1. Control – sin adición de aditivos, Tratamiento 2. 0,5 ml, Tratamiento 3. 0,75 ml y Tratamiento 4. 1 ml de (AE) animal/día y tres repeticiones (tres animales por cada unidad experimental). Los periodos experimentales fueron de 20 días, 16 días destinados a adaptación y 4 días para colectas en jaulas metabólicas. La dieta suministrada fue Forraje: Concentrado en proporción 60:40% respectivamente con base en la materia seca, usando como alimento voluminoso el ensilaje de maíz y como alimento concentrado una mezcla balanceada de maíz, torta de soya y suplemento mineral. La digestibilidad aparente se estimó de acuerdo con la fórmula: $[(\text{Ingestión} - \text{Excreción}) / \text{Ingestión} \times 100]$. Los Nutrientes digestibles totales se estimaron con la fórmula: $(\text{NDT}) (\%) = \text{PC digestible} + \text{FDN digestible} + \text{CNF digestibles} + (\text{EE digestible} \times 2,25)$. El efecto de las inclusiones fue estudiado por regresión polinomial y el efecto entre los tratamientos fue evaluado por comparación de las medias por medio del test de Dunnett con un 5% de probabilidad mediante el programa estadístico Minitab 17™ (2014). La inclusión de AE tuvo en efecto lineal positivo ($P < 0,05$) en la ingestión de materia seca (MS) y fibra en detergente neutro (FDN) sobre los tratamientos. Igualmente, la ingestión de PC fue influenciada por los AE ($P < 0,05$). En la digestibilidad de FDN se encontró un efecto cuadrático negativo ($P = 0,0444$) en niveles por encima de 0,5 ml de AE/animal/día. Entre tratamientos igualmente, la digestibilidad de la MS y FDN fue mayor (73,75 y 58,28% respectivamente) en el tratamiento con 0,5 ml de AE/animal/día. Similarmente, en el NDT la inclusión de 0,5 ml de AE/animal/día fue mayor (70,73%) en comparación con los demás

tratamientos ($P < 0,05$). La inclusión de AE de ajo y orégano a bajas dosis y en mezcla presento mayor efectividad para mejorar la degradación de la fibra y la digestibilidad aparente total en el presente experimento

PALABRAS CLAVES: Metano, Resistencia microbiana, Ovinos, Reemplazo.

2. ABSTRACT

Essential oils are an alternative to replace the use of antibiotic additives in ruminant diets for their effect on ruminal fermentation, improving digestibility and decreasing energy losses in the form of methane. The objective of this study was to evaluate the inclusion of a mixture of essential oils (AE) of garlic (*Allium sativum*) and oregano (*Origanum vulgare*) in equal parts on in vivo digestibility in meat sheep. Twelve whole male short-haired African sheep were used, which were distributed in a 4X4 Latin square design with four treatments: 1. Control - no additives added, Treatment 2. 0.5 ml, Treatment 3. 0.75 ml and Treatment 4. 1 ml of (AE) animal / day and three repetitions (three animals for each experimental unit). The experimental periods were 20 days, 16 days for adaptation and 4 days for collections in metabolic cages. The diet provided was Fodder: Concentrated in proportion 60: 40% respectively based on dry matter, using corn silage as a bulky food and as a concentrated food a balanced mixture of corn, soy cake and mineral supplement. The apparent digestibility was estimated according to the formula: $[(\text{Ingestion} - \text{Excretion}) / \text{Ingestion} \times 100]$. Total digestible nutrients were estimated with the formula: $(\text{NDT} (\%) = \text{digestible PC} + \text{digestible NDF} + \text{digestible CNF} + (\text{digestible EE} \times 2.25))$. The effect of the inclusions was studied by polynomial regression and the effect between the treatments was evaluated by comparison of the means by means of the Dunnett test with a 5% probability by means of the statistical program Minitab 17™ (2014). The inclusion of AE had a positive linear effect ($P < 0.05$) in the ingestion of dry matter (DM) and fiber in neutral detergent (NDF) on the treatments. Similarly, PC ingestion was influenced by AE ($P < 0.05$). In the digestibility of NDF a negative quadratic effect ($P = 0.0444$) was found at levels above 0.5 ml of AE / animal / day. Among treatments, the digestibility of DM and NDF was higher (73.75 and 58.28% respectively) in the treatment with 0.5 ml of AE / animal / day. Similarly, in the NDT the inclusion of 0.5 ml of AE / animal / day was higher (70.73%) compared to the other treatments ($P < 0.05$). The inclusion of AE of garlic and oregano at low doses and in mixture was more effective in improving fiber degradation and total apparent digestibility in the present experiment.

KEYWORDS: Methane, Microbial resistance, Sheep, Replacement.

3. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción pecuarios que se desarrollan en el país han optimizado sus producciones por medio de estrategias basadas en el suministro de alimentos balanceados (alimentos concentrados), evidenciando resultados positivos en el desempeño animal (Morales & Ortiz, 2018). Sin embargo, al ser ofrecidos en grandes cantidades trae consigo modificaciones en el metabolismo ruminal (Oba & Wertz-Lutz, 2011). El uso de aditivos antibióticos ayuda a controlar la fermentación ruminal, mejorando la digestibilidad y ejerciendo control sobre microorganismos metanogénicos a nivel ruminal (Ranga Niroshan Appuhamy *et al.*, 2013), mejorando la utilización energética y disminuyendo la producción de metano. Sin embargo, la implementación de este tipo de aditivos ha sido cuestionado, debido a la posibilidad de generar residualidad del antibiótico en los productos obtenidos como son carne y leche, alterando su inocuidad y provocando una resistencia antibiótica en el consumidor (Robinson *et al.*, 2017).

Ante la demanda de alimentos inocuos por parte del consumidor, en algunos países se han establecido restricciones para el uso de antibióticos como aditivos nutricionales (Castanon, 2007). Esta situación ha estimulado el uso de nuevas alternativas en este campo, como es el caso de aditivos naturales provenientes de plantas como son los aceites esenciales (AE) (Zhang *et al.*, 2005). Este tipo de aditivos presentan una gran variedad de propiedades entre las que se encuentran funciones antioxidantes, antiparasitarias, antiinflamatorias, antidiarreicas (Martínez *et al.*, 2015), antifúngicas, antivirales y antibacterianas (Solorzano *et al.* 2011). Esta última es de gran importancia ya que modula el proceso de fermentación ruminal, inhibiendo bacterias generadoras de nitrógeno amoniacal (Moreno *et al.*, 2009; Giannenas *et al.*, 2011; Tager y Krause, 2011) mejoran la digestibilidad y el aprovechamiento de los alimentos. Esta condición refleja un mejoramiento en los parámetros productivos en los sistemas de producción animal (Patra *et al.*, 2009).

Los AE surgen como una alternativa natural para reemplazar el uso de aditivos químicos como antibióticos, al mejorar la digestibilidad de los alimentos, regular la

fermentación ruminal, disminuir la producción de metano, así como evitar la resistencia bacteriana generada por los residuos de antibióticos en los alimentos consumido por las personas.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la inclusión de aceite esencial de Ajo (*Allium sativum*) y Orégano (*Origanum vulgare*) en dietas para rumiantes como aditivo sobre la digestibilidad.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el consumo de dietas con diferentes inclusiones de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en ovinos mestizos de carne bajo condiciones de confinamiento.
- Determinar la digestibilidad *in vivo* de dietas con diferentes niveles de inclusión de aceites esenciales de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en ovinos mestizos de carne bajo condiciones de confinamiento.

5. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

5.1 Aceites esenciales

Los AE son metabolitos secundarios con función de defensa en las plantas (Sangwan, et al., 2001), que químicamente poseen compuestos de naturaleza volátil y en su mayoría son lipofílicos. Los AE son obtenidos por diferentes procesos, siendo uno de los más extendidos el proceso de hidrodestilación (Bakkali *et al.*, 2008). En la naturaleza los aceites presentan funciones importantes para las plantas al dar una protección sobre agentes bióticos y abióticos como bacterias, virus, hongos e insectos, entre otros, además, en ocasiones facilitan la atracción de organismos beneficiosos que favorecen la polinización y dispersión de las semillas de las plantas (Acamovic y Brooker, 2005; Wink, 1999).

5.2 Componentes de los aceites esenciales

Los componentes de los AE se clasifican en dos grupos los terpenoides (monoterpenos y sesquiterpenos) y fenilpropanoide (Calsamiglia et al., 2007). Son considerados como sustancias seguras para el consumo humano y animal, de acuerdo con la U.S. Food and Drug Administration - FDA (2006), pueden ser extraídos de diversas partes de una planta, incluyendo hojas, flores, semillas, corteza y raíces, y su composición puede variar en cada parte de la planta (Benchaar et al., 2008). Puede ser obtenido por fermentación, la destilación y la extrusión, el último es el método más utilizado para la producción industrial (Burt, 2004).

5.3 Mecanismo de acción de los aceites esenciales

El mecanismo de acción de estos compuestos no está bien descrito, pero se ha observado que presenta una acción bactericida sobre las Gram negativas y Gram positivas (Chao *et al.*, 2000), al ser sustancias hidrófobas, estas, ocupan los

espacios entre las cadenas de ácidos grasos (Polin *et al.*, 2014) presentes en la membrana fosfolípida gracias a pequeño tamaño (Bakkali *et al.*, 2008), ejerciendo su efecto antimicrobiano mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana, interrumpiendo los procesos de transporte de iones y la interacción con las proteínas y otros componentes citoplasmáticos. Esto altera la estructura de las membranas, haciéndolas más fluidas y permeables, permitiendo la fuga de contenido citoplásmico y otros iones (Carson *et al.*, 2002). Como medida de defensa, las bacterias intentan contrarrestar los efectos realizando una concentración de energía sobre la bomba de iones trayendo consigo un crecimiento lento de las bacterias que se va a ver reflejado en cambios de la proporción poblacional de las bacterias a nivel ruminal (Calsamiglia *et al.*, 2007).

Helander *et al.* (1998) demostraron que el timol, extraído del tomillo (*Thymus vulgaris*) y Carvacrol, extraído del orégano (*Origanum vulgare*), interrumpen la membrana celular al disminuir el ATP intracelular aumentando el ATP extracelular en *E. coli*. Burt (2004) sugirió que las bacterias Gram-positivas parecen más susceptibles a las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales que las bacterias Gram-negativas. Esto se puede esperar porque las bacterias Gram-negativas tienen una capa exterior que rodea su pared celular que actúa como una barrera de permeabilidad al limitar el acceso de compuestos hidrófobos. Se ha demostrado que los AE actúan de una forma similar a los ionóforos disminuyendo la relación acetato:propionato.

Mohammed *et al.* (2004) informaron de una disminución de la proporción de acetato:propionato con el uso de ciclodextrina (extraído del clavo) encapsulado *in vitro* e *in vivo*. Busquet *et al.* (2005) utilizando cinamaldehído y aceite de ajo añadido en dos dosis (31,2 y 312 mg / l de líquido de cultivo) en un estudio de cultivo continuo encontraron que el cinamaldehído en la dosis más baja y el aceite de ajo en la dosis más alta disminuyeron la proporción de acetato y propionato. También se cree que los aceites esenciales pueden estimular la producción de saliva y gástrico y los jugos pancreáticos, la promoción de la secreción de enzimas, lo que aumenta la digestibilidad (Mellor, 2000).

5.4 Efecto de los aceites esenciales sobre la digestibilidad.

Los AE ejercen un beneficio sobre la digestión de los rumiantes al reducir la degradación de proteína en el rumen al provocar una inhibición en la proliferación de las bacterias generadoras de nitrógeno amoniacal, además, de reducir la degradación de almidones, favoreciendo el flujo de estos dos nutrientes al intestino (Hart *et al.*, 2008), sin embargo, cuando se suministran grandes dosis de AE se presenta una decreción sobre la digestibilidad de la materia seca debido a la reducción de la fibra en el rumen (Beauchemin *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

5.5 Importancia de los aceites esenciales

El mercado mundial compite en la diferenciación y mayor apreciación de los atributos de los productos cárnicos (Jouany y Morgavi, 2007). 26 países integrantes de La Organización Mundial del Comercio (OMC), presentaron notificaciones de medidas técnicas que se aplican de alguna manera a la carne, por un total de 134 notificaciones. Entre estas medidas, 25 tienen enfoque normativo a los productos que se aplican a los sistemas de producción animal, como los fertilizantes, herbicidas, antibióticos y otros medicamentos que podrían generar niveles inaceptables de residuos en productos cárnicos (FAO, 2001; MacDunoff, 2006). En el nuevo panorama de comercialización, frente al Tratado de Libre Comercio (TLC), nuevos y exigentes mercados demandarán productos diferenciados e inocuos.

De acuerdo con Russell y Houlihan (2003), las restricciones sobre el uso de antibióticos en la alimentación animal, son basadas en las preocupaciones de resistencia microorganismos con la acción terapéutica de los antibióticos en los seres humanos. Igualmente, los consumidores están exigiendo productos diferenciados de mayor valor nutricional y con cualidades sanitarias que permitan asegurar no solo su calidad sino también su inocuidad. Los extractos de AE, han demostrado ser eficaces en la modulación de la fermentación ruminal y la mejora de la digestibilidad en rumiantes. La investigación de compuestos bioactivos como

los AE, en sustitución de los antibióticos en la alimentación de rumiantes es necesaria para comprender sus efectos en la digestibilidad y a nivel ruminal.

5.6 Aceite esencial de ajo (*Allium sativum*)

El ajo (*Allium sativum*) es una especie perteneciente a la familia Liliaceae y originaria de Asia central (Bender et al. 2013). Históricamente ha sido utilizada en remedios herbales por sus diversos beneficios en la salud (Khaled et al. 2010). Además, de este se obtiene el AE de ajo conocido por sus propiedades contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, encontrándose principalmente como principios activos el aliina, sulfuro de dialilo, el trisulfuro de dialilo y la alicina, siendo más predominante este último, responsable del olor característico y su efecto antimicrobiano (Chekki et al. 2014)

Busquet *et al.*, (2005), en estudio *in vitro* con AE de Ajo en concentraciones de 30, 300 y 3000 mg / L en una dieta con proporciones de forraje y concentrado de 50:50, determinaron que puede reducir la relación Acetato; Propionato, además de disminuir niveles de amoniaco.

Un estudio realizado por (Busquet *et al.*, 2006) determinó de forma *in vitro* que la inclusión de 3000 mg/L de AE de ajo presentó una reducción de los niveles de concentración de los ácidos grasos volátiles totales siendo de 137.5 mM con respecto al tratamiento control que fue de 160.5 mM en una dieta 50:50 forraje: concentrado.

5.7 Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta aromática perteneciente a la familia *Lamiaceae* (Kintzios,2002). Tradicionalmente ha sido empleada en la medicina convencional, debido a su relevancia, en los últimos años se han evaluado sus propiedades químicas encontrando cualidades antioxidantes, antimicrobianas,

entre otras (Amadios et al. 2010). Los principales fenoles del AE orégano se encuentra el carvacrol y el timol constituyendo entre el 78-85% del total del aceite y son los que ejercen gran parte de la actividad microbiana (Nuñez, 2011), otros compuestos encontrados son terpineno, p-cimeno y linalol (Burt, 2004).

Simitzis et al (2007) investigaron el efecto de AE de orégano en la dieta de 8 corderos machos y 8 hembras, siendo separados en dos grupos, un grupo recibió el tratamiento control a base de concentrado y heno de alfalfa, el otro tratamiento fue similar a acepción del suministro de aceite esencial en el concentrado a una dosis de 1 ml / kg de concentrado, sin encontrarse una diferencia significativa en la ganancia de peso final, el rendimiento en canal y el aumento de peso corporal, sin embargo se encontró que su incorporación retardo el proceso de oxidación de lípidos la carne almacenada por un largo tiempo.

En estudio realizado por Hristov en el 2013, encontraron de forma *in vivo* que la inclusión de AE orégano a niveles de 250 g/d, 500 g/d y 750 g/d presento una disminución en la concentración de amoniaco, siendo una reducción lineal después de las primeras 8 horas posterior a la alimentación. Además, la ingesta de MS disminuyó sin afectar la producción de leche optimizando la eficiencia alimentaria.

Busquet *et al.*, 2006 estableció que al incluir 300 mg/L y de 3000 mg/L de AE de orégano los ácidos grasos volátiles totales presentaron una reducción (149.6 Mm) en comparación con el tratamiento control (155.9 mM).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto fue aprobado por el comité de bioética de la Universidad del Tolima, otorgando el aval bioético según acta número 03 de 2016.

6.1 Animales y dieta

12 ovinos Africanos de Pelo machos enteros, con peso vivo de $20 \pm 2,5$ kg, fueron estabulados en corrales con 3 animales por corral. Fueron alimentados dos veces al día con acceso libre a agua. Todos los animales fueron alimentados con la misma dieta base (Tabla 1) la cual fue formulada de acuerdo con los requerimientos de NRC (2007), con 11,55% de Proteína cruda (PC), 40,63% de Fibra en detergente neutro (FDN), 3,45% de extracto etéreo (EE) y 68% de Nutrientes digestibles totales (NDT) con base en la materia seca. La dieta estaba constituida de alimento voluminoso (ensilaje de maíz) y concentrado (maíz, torta de soya, melaza, fosfato bicálcico, premezcla mineral) en proporción 60:40 % con base a la materia seca (MS). Los AE fueron suministrados diariamente vía oral para garantizar el consumo de estos. Fueron mezclados en partes iguales (v/v), siendo llevados en todos los casos a volumen de 5 ml usando como vehículo glicerol y posteriormente se suministraron con jeringa vía oral. En el caso del tratamiento control fueron suministrados 5 ml de glicerol sin inclusión de AE. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en cuatro tratamientos: Tratamiento 1. Control – sin adición de aditivos, Tratamiento 2. 0,5 ml, Tratamiento 3. 0,75 ml y Tratamiento 4. 1 ml de (AE) animal/día.

Tabla 1. Composición química de la ración total mezclada y composición porcentual de los ingredientes utilizados en la dieta basal

Ingredientes y Composición química de las dietas	
	% de la MS
Ingrediente	
Ensilaje de Maíz	60,00
Maíz molido	21,00
Torta de Soya	17,00

Fosfato bicálcico	1,10
Melaza	0,01
Premezcla Mineral ¹	0,89
Composición química	
Proteína Cruda (PC)	11,55
Fibra en Detergente Neutro (FDN)	40,63
Extracto etéreo (EE)	3,45
Nutrientes digestibles totales (NDT)	68,00

¹ Calcio: 130,0g (máx.), Fósforo: 65,0g (mín.), Sodio: 135,0g, Azufre: 12,0g, Magnesio: 12 g, Manganeso: 1.050 mg, Cobalto: 63 mg, Yodo: 63 mg, Cobre: 1.155 mg, Selenio: 18- mg, Zinc: 3.080- mg y Flúor: 650 mg.

6.2 Digestibilidad y diseño

Los animales fueron alojados en corrales grupales provistos con comederos y bebederos. La alimentación fue ofrecida en forma de mezcla completa *ad libitum*, dos veces por día, en la mañana (8:30 am) y en la tarde (4:30 pm). El consumo fue ajustado para permitir 5 a 10% de sobras del alimento ofrecido. Los animales fueron distribuidos en un diseño de cuadrado latino 4 X 4 en cuatro periodos de 20 días cada uno (Tabla 2), los primeros 16 días destinados a la adaptación de los animales a las dietas experimentales en los corrales grupales por tratamiento y los últimos cuatro días para colecta de muestras (sobras y heces) en jaulas metabólicas individuales.

Tabla 2. Cuadrado latino Crossover para evaluar digestibilidad *in vivo* de dietas con niveles de inclusión de aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en ovinos africanos de pelo corto.

Periodos experimentales	Animal											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 (20 días)	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3	T4	T4	T4
2 (20 días)	T2	T2	T2	T3	T3	T3	T4	T4	T4	T1	T1	T1
3 (20 días)	T3	T3	T3	T4	T4	T4	T1	T1	T1	T2	T2	T2
4 (20 días)	T4	T4	T4	T1	T1	T1	T2	T2	T2	T3	T3	T3

T1= control; T2= Inclusión de 0, 5 ml de AE; T3= Inclusión de 0,75 ml de AE; T4= Inclusión de 1,0 ml de AE.

Para estimar la digestibilidad, muestras de alimentos, sobras, heces y fueron tomadas durante los periodos de colectas diariamente y fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio, totalizando 4 muestras por animal/tratamiento/período. Estas muestras fueron pre-secadas en estufa a 55°C por 72 horas y posteriormente molidas en molino a 1 mm.

6.4 Análisis proximal

Composición química (MS, MM, MO, PB, FDN, FDA e EE) fue determinada según la metodología de la AOAC (2005). Las determinaciones de fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) se realizaron de acuerdo con Van Soest et al. (1991). Los carbohidratos totales (CT) fueron obtenidos por la ecuación: $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$. Los carbohidratos no fibrosos (CNF) fueron determinados por la diferencia entre CT y FDN (sin corrección para proteína), según las fórmulas de Sniffen et al. (1992). Para el NDT se utilizó la fórmula: $NDT (\%) = PB \text{ digestible} + FDN \text{ digestible} + \text{carbohidratos no-fibrosos digestibles} + (EE \text{ digestible} \times 2,25)$, conforme recomendación de Sniffen et al. (1992).

6.7 Estadística

El diseño experimental fue un diseño cuadrado latino 4x4. Fue realizado un análisis de varianza usando la metodología de modelos mixtos por medio del paquete estadístico del software MINITAB 17™ (2014). El efecto de los niveles de inclusión de AE fue analizado igualmente por modelos de regresión polinomial. El modelo matemático usado incluía el efecto del periodo, tratamiento y animal, que fue considerado aleatorio, de acuerdo con el siguiente modelo $Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$ donde:

μ = media de los tratamientos;

A_i = efecto del animal i , (1...4)

P_j = efecto del periodo j , (1...4)

T_k = efecto del tratamiento k , (1...4).

e_{ijk} = error aleatorio

Diferencias significativas fueron aceptadas con una probabilidad de $P \leq 0,05$ por el Test de Dunnet.

7. RESULTADOS

Se observó una tendencia lineal en el consumo de alimento para la MS ($P=0,069$) y CNF ($P=0,076$), en función de las inclusiones de AE de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en niveles encima de 0,5 ml AE/animal/día (Tabla 3). Para el FDN se observó igualmente un efecto lineal ($P<0,030$) en niveles por encima de 0,5 ml/animal/día. Para la PB y EE no se encontró efecto de las inclusiones en el consumo ($P>0,05$)

Tabla 3. Consumo en ovinos africanos de pelo corto suplementados con diferentes niveles de aceite esencial de Ajo (*Allium sativum*) y Orégano (*Origanum vulgare*).

Ítem	+AE Inclusión ml/día				EEM ¹	P-Valor	
	Control	0,5 ml	0,75 ml	1,00 ml		Linear	Cuadrático
	Consumo g / día						
Materia seca	587,79b	756,27a	912,87a	889,94a	28,30	0,069	0,860
Proteína Bruta	116,22b	110,16a	119,34a	109,70a	5,16	0,180	0,627
Carbohidratos no fibrosos	290,30	283,77	240,17	239,57	10,14	0,076	0,896
Fibra en detergente neutro	290,02b	287,56a	323,36a	298,32a	10,76a	0,030	0,701
Extracto etéreo	29,93	32,63	27,91	31,07	1,13	0,915	0,957

¹EEM: Error estándar de la media. ²NDT = Nutrientes digestibles totales. Medias con letras minúsculas diferentes en la misma línea poseen diferencias estadísticas por el test de Dunnet

Fueron observadas diferencias para el consumo de MS, PB y FDN ($P<0,05$) de las inclusiones con el tratamiento control. En la MS las inclusiones con AE ($P<0,05$) tuvieron mayor consumo, evidenciando un valor promedio 853 gr MS/día, en comparación con el tratamiento control (587 gr MS / día). El consumo de PB la inclusión de 0,5 ml y 1 ml (110,16 g/día y 109,70 g/día) presentaron menor consumo que el control (116,22 g/día), pero fue mayor con 0,75 ml (119,34 g/día) ($P<0,05$). El consumo de FDN fue superior en las dietas con inclusión de 0,75 ml y 1 ml

(323,36 g/día y 298,32 g/día respectivamente) con respecto al control (290,02 g/día), en tanto que con la inclusión de 0,5 ml (287,56 g/día) fue inferior.

En cuanto a la digestibilidad (Tabla 4.), las inclusiones de AE presentaron un efecto cuadrático negativo ($P=0,044$) a partir de 0,5 ml AE /animal /día. La digestibilidad de la MS (73,75%), FDN (58,28%) y NDT (70,73%) fue significativamente mayor ($P<0,05$) en la inclusión con 0,5 ml de AE /animal/día.

Tabla 4. Digestibilidad aparente total en ovinos africanos de pelo suplementados con diferentes niveles de aceite esencial de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*).

Ítem	+AE Inclusión ml/día				EEM ¹	P-Valor	
	Control	0,5 ml	0,75 ml	1,00 ml		Linear	Cuadrático
	Digestibilidad g / Kg						
Materia seca	69,14b	73,75a	72,75b	73,14b	0,64	0,274	0,963
Proteína Bruta	66,34	68,94	67,44	65,94	1,11	0,454	0,686
Carbohidratos no fibrosos	90,13	90,60	88,75	89,60	0,60	0,978	0,779
Fibra en detergente neutro	54,53b	58,28a	58,62b	59,56b	1,18	0,104	0,044
Extracto etéreo	78,71	82,11	78,51	82,36	0,93	0,796	0,870
NDT ²	69,85b	70,73a	73,75b	70,29b	0,59	0,160	0,134

¹EEM: Error estándar de la media. ²NDT = Nutrientes digestibles totales. Medias con letras minúsculas diferentes en la misma línea poseen diferencias estadísticas por el test de Dunnet

8. DISCUSIÓN

CONSUMO

Con las inclusiones de AE de ajo y orégano se observó un mayor consumo de MS en comparación con el tratamiento control, con una tendencia lineal ($P=0,069$). El mayor consumo de alimento observado puede estar asociado a una respuesta positiva en la fermentación ruminal, asociado a un aumento en la producción de propionato a nivel ruminal, efecto positivo asociado a al uso de estos aditivos (Oh, Harper, & Hristov, 2019).

Resultados similares fueron obtenidos por Busquets *et al.*, (2006) evaluando la digestibilidad *in vitro* de ajo y orégano (entre otros aceites esenciales) mostraron incrementos en la producción de propionato y disminución de acetato y butirato a nivel ruminal. Igualmente, Cardozo *et al.*, (2005) evaluando los efectos de la inclusión AE ajo (7,5 mg/kg) *in vitro* encontraron una reducción del acetato y el aumento del propionato. Yang *et al.* (2007) estudiaron los efectos del AE ajo en el metabolismo ruminal determinando un aumento del propionato y un decrecimiento del ácido acético y butírico. Busquet *et al.* (2005) evaluaron la inclusión *in vitro* de 300 mg/L AE de ajo, encontrando una reducción el acetato e incrementó en el propionato, sugiriendo que la producción de metano fue reducida.

Los AE actúan sobre la microbiota ruminal, ejerciendo un efecto antibacterial mayor sobre bacterias Gram Positivas, actuando en la membrana lipídica donde se acumulan (Benchaar & Greathead, 2011), modificando las proporciones de ácidos grasos volátiles aumentando la proporción de propionato y disminuyendo las pérdidas por metano (Cobellis, Trabalza-marinucci, & Yu, 2016).

El consumo de PB también se vio positivamente influenciado por la inclusión de los aceites evaluados en la dieta ($P>0,05$) respecto al control. (Klevenhuseh *et al.* 2011) con inclusión de 5 g/kg AE ajo en la dieta de ovejas no evidenciaron diferencias en el consumo de PB con respecto al control. El efecto en el consumo de PB, puede ser consecuente con el comportamiento observado en el consumo de MS.

En el consumo de FDN se observó un efecto lineal positivo ($P=0,039$) con las inclusiones de AE. Esto mediado por un mayor consumo de MS, además que puede ser atribuido a un mayor aprovechamiento de la fibra.

Klevenhusen et al. (2011). Evaluando la inclusión de 5 g/kg de AE de ajo en ovejas no encontró un efecto sobre el consumo de fibra. Igualmente, Yang et al (2007) con la inclusión de 5 g/animal día en vacas no encontró efecto sobre el consumo de FDN en dietas con adición de AE de ajo.

El consumo está directamente relacionado a la tasa de digestión de la fibra en el rumen, un mayor consumo de fibra está asociado a una mayor tasa de desaparacimiento a nivel ruminal (Mertens, 1979). En el presente estudio el sinergismo de los AE de Ajo y Orégano tuvo un efecto directo en el consumo de FDN.

DIGESTIBILIDAD

La digestibilidad de la MS con la dosis más baja de AE (0.5 ml) fue superior en comparación con los otros tratamientos. Cobellis et al., (2015) evaluando *in vitro* diferentes inclusiones de AE de orégano 0,5 g/L, 1,0 g/L, 1,5 g/L y 2,0 g/L, obtuvieron una disminución de la digestibilidad de la MS (64.67%, 53.17%, 51.83% y 51.83% respectivamente). Los efectos negativos en la digestibilidad de la MS se deben a que dosis altas de AE orégano poseen una mayor actividad antimicrobiana afectando el microbiota ruminal, disminuyendo la digestibilidad. Los AE poseen un efecto mayor en bajas dosis y en mezcla. En el presente estudio en la dosis más baja se observó un efecto mayor sobre la digestibilidad.

Se observó un aumento en la digestibilidad de la FDN con la inclusión de 0,5 ml de AE de ajo y orégano en la dieta (58.28 g/kg) en comparación con el control (54,53 g/kg). Los AE a dosis bajas tienen efectos benéficos en la digestibilidad de FDN atribuidos a una mejor disponibilidad de energía para los microorganismos ruminales, siendo que dosis altas causan efectos deletéreos en la digestibilidad de la fibra por su efecto antimicrobiano. Klevenhusen et al. (2011), con la inclusión de

2 g/kg de disulfuro de dialilo (principio activo del AE de ajo) en dieta para ovejas de montaña suizas negro-marrón, encontraron un aumento en la digestibilidad de FDN, sin embargo, no se encontró ningún efecto sobre la relación acético: propionato. Lo que permite inferir que el disulfato de dialilo tuvo un efecto mayor a bajas dosis.

(Patra & Yu, 2012) evaluando cinco AE (Clavo, eucalipto, ajo, orégano y menta) en diferentes niveles *in vitro* (0, 25, 0,5 y 1 g/L) encontraron un efecto negativo sobre la digestibilidad de la MS y la fibra en las dosis más altas, posiblemente relacionado con su efecto en la microbiota ruminal. Debido a que los AE en altas dosis pueden presentar un fuerte efecto antibacterial.

9. CONCLUSIONES

Los AE de ajo (*Allium sativum*) y orégano (*Origanum vulgare*) en las diferentes dosis mostraron una mejor aceptación por parte de los animales en el consumo de MS, PB y FDN en comparación con la dieta sin AE. La digestibilidad mejoró con 0,5 ml AE/animal/día en los parámetros de MS, FDN Y NDT con respecto al control infiriendo que las dosis bajas tienen efecto en la digestibilidad.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 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
- Amadio, C., Medina, R., Dediol, C., Zimmermann, M & Miralles, S. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario. *Rev. FCA UNCUYO*. ISSN 0370-4661. Tomo 43. N° 1. Año 2011. 237-245.
- Andrade, E., Martínez, A., Castelán, O., Ríos, J., Pacheco, Y., & Estrada, J. Producción de metano utilizando plantas taníferas como sustrato en fermentación ruminal in vitro y efecto de extractos fenólicos en la microflora ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 (2012): 301 - 312
- Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46:446–475.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1), 209-228.
- Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 338–355.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.024>
- Bender-Bojalil D, Bárcenas-Pozos M E. El ajo y sus aplicaciones en la conservación de los alimentos. *Revista Temas Selectos Ingeniera en Alimentos*. 2013; 7(1): 25-36.

- Beauchemin, K., McGinn, S., & McAllister, T. (2009). Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *Rev. Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour*, 2009;4:1-18.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Cardozo, P. W., & Kamel, C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2508-2516.
- Busquet, M; Calsamiglia, S; Ferret, A & Kamel, C. (2006). Plant Extracts Affect In Vitro Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science* Vol. 89 No. 2, 2006.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.
- Cardozo, P. W., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 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. *J. Anim. Sci.* 83:2572–2579.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.
- Carson, C. F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill,

lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1914-1920.

Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 2007; 86:2466-2471.

Chekki, R., Snoussi, A., Hamrouni, I & Bouzouita, N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of Tunisian garlic (*Allium sativum*) essential oil and ethanol extract. *Mediterranean Journal of Chemistry* 2014, 3(4), 947-956

Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, 12(5), 639-649.

Chaves, A. V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., & Benchaar, C. (2008). *Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. Livestock Science*, 117(2-3), 215–224. doi: 10.1016/j.livsci.2007.12.013

Cobellis, G., Petrozzi, A., Forte, C., Acuti, G., Orrù, M., Marcotullio, M., Aquino, A., Nicolini, A., Mazza, V., & Trabalza-Marinucci, M. Evaluation of the Effects of Mitigation on Methane and Ammonia Production by Using *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils on *in Vitro* Rumen Fermentation Systems. *Sustainability* 2015, 7, 12856-12869; doi:10.3390/su70912856

Cobellis, G., Trabalza-marinucci, M., & Yu, Z. (2016). Science of the Total Environment Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition : A review. *Science of the Total Environment*, 546, 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>

Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;(88):308-316.

Giannenas I, Skoufos J, Giannakopoulos C, Wiemann M, Gortzi O, Lalas S, Kyriazakis I (2011) Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 94: 5569-5577

Hart, K., Yañez Ruiz, D., Duvel, S., McEwan, N., & Newbold. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science Tech*, (147):8-35.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.

Hristov, A. L., Cassidy, C., Heyler, T., Tekippe, J., Varga., G., Corl, B., & Brandt, R. C. (2013). Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *J. Dairy Science*, 96 :1189–1202.

Jouany, J. P., & Morgavi, D. P. (2007). Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production.

Kintzios, E. Orégano. 2002. The genera *Origanum* and *Lippia*. Taylor & Francis. 267p.

Khaled Rahman, Bioactive foods in promoting health: Chapter 16 - Garlic and Heart Health, ed. By Elsevier, 2010, 235-244.

Klevenhusen, F; Zeitz, J; Duval, S; Kreuzer, M & Soliva, C. (2011). Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 166– 167 (2011) 356– 363

Klevenhusen, F., Zeitz, J. O., Duval, S., Kreuzer, M., & Soliva, C. R. (2011). Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166–167, 356–363. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.071>

Mellor, S. (2000). Alternatives to antibiotics. *Pig Progress*, 16(1), 18-21.

Mertens, D. R., & Ely, L. O. (1979). A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *Journal of Animal Science*, 49(4), 1085-1095.

Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z. A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., ... & Itabashi, H. (2004). Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers. *Journal of animal science*, 82(6), 1839-1846.

Moreno JCG, Osollo LME, Prieto MC, Janacua HV. (2009) Efecto dietético de los aceites esenciales de *origanum vulgare* sobre el comportamiento productivo de ovinos. En *Mem. XIX Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos*. pp. 213-216.

National Research Council (US). Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants, National Research Council, Committee on the Nutrient

Requirements of Small Ruminants, Board on Agriculture, Division on Earth, & Life Studies. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids.

Oba, M.;Wertz-Lutz, A.E. Ruminant nutrition symposium: Acidosis: New insights into the persistent problem. *Journal of Animal Science*, v.89, n.4, p.1090-1091, 2011.

Oh, J., Harper, M., & Hristov, A. N. (2019). Effects of lowering crude protein supply alone or in a combination with essential oils on productivity, rumen function and nutrient utilization in dairy cows. *Animal*, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001083>

Patra AK, Saxena J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton Leeuwe Int J G* 2009;(96):363-375.

Patra, A. K., & Yu, Z. (2012). Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4271–4280. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>

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.

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.

Russell, J. B., & Houlihan, A. J. (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(1), 65–74.

Sangwan, N.S., Farooqi, A.H.A., Shabih, F., Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.*, 34(1), 3–21. <https://doi.org/10.1023/A:1013386921596>

Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., Bizelis, J. A., Dardamani, A., Theodosiou, I., & Fegeros, K. (2008). *Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics*. *Meat Science*, 79(2), 217–223. doi:10.1016/j.meatsci.2007.09.005

Solorzano F, Miranda MG. 2011. Essential oils from aromatic herbs as a antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 1-6.

Tager LR, Krause KM (2011) Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 2455-2464.

Wink M, Schimmer O. Modes of action of defensive secondary metabolites. In: Wink M editor. *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. Sheffield UK: Sheffield Academic Press; 1999;17-112.

Yang, W., Ametaj, B., Benchaar, C., & Beauchemin, K. (2010). Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: Ruminal and intestinal digestion. *Journal Animal Science*, (88):680-688.

Yang, W., Benchaar, C., Ametaj, B., Chaves, A., He, H and McAllister, T. 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* Vol. 90 No. 12, 2007.

Zhang KY, Yan F, Keen CA, Waldroup PW. Use of essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *Int J Poult Sci* 2005; 4:612-619.