



Revisión [Review]

USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS PARA
REDUCIR LA METANOGÉNESIS RUMINAL

[USE OF PLANT SECONDARY METABOLITES TO REDUCE RUMINAL
METHANOGENESIS]

M. Vélez-Terranova*, R. Campos Gaona* and H. Sánchez-Guerrero*

Grupo de Investigación “Conservación, mejoramiento y utilización del ganado criollo Hartón del Valle y otros recursos genéticos animales en el suroccidente colombiano”. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Nacional de Colombia. Carrera 32 No 12 - 00 Chapinero, Vía Candelaria, Palmira - Valle del Cauca – Colombia. E-mails: omvelezt@unal.edu.co; rcamposg@unal.edu.co;

hsanchezgu@unal.edu.co

**Corresponding author*

RESUMEN

Actualmente existe una gran preocupación por la emisión de gases de efecto invernadero y su contribución al calentamiento global. Los rumiantes aportan a la emisión de estos gases a través de la producción de metano entérico, un gas cuyo potencial de calentamiento es 21 veces superior que el CO₂, y que se considera una pérdida energética para el animal. El uso de antibióticos ha sido útil para reducir la metanogénesis, sin embargo su uso ha sido prohibido en algunos países, además las exigencias actuales de los mercados están dirigidas a la obtención de productos animales saludables y con bajo impacto ambiental. Una alternativa de mitigación natural que está ganando mucha atención en la nutrición animal es el uso de metabolitos secundarios de las plantas. Diversos estudios han demostrado la capacidad que tienen ciertos compuestos secundarios de reducir la metanogénesis a través de diferentes formas de acción. En la presente revisión se describirán en profundidad los metabolitos secundarios que más han sido estudiados y que han demostrado reducir la producción de metano entérico y su efecto sobre los parámetros de fermentación. Finalmente, se resalta la necesidad de identificación de nuevos compuestos y se sugieren los aspectos metodológicos a tener en cuenta.

Palabras clave: Cambio climático; metabolitos secundarios; metano; rumiantes.

SUMMARY

Currently, there is a great concern for the greenhouse gas emissions and their contribution to global warming. Ruminants contribute to the emission of these gases through the production of enteric methane, a gas whose warming potential is 21 times higher than CO₂, and is considered an energy loss for the animal. The use of antibiotics have been helpful in reducing ruminal methanogenesis, however, the use of these compounds have been banned in some countries, in addition, current market requirements are aimed at obtaining healthy animal products with low environmental impact. A natural mitigation alternative that is gaining attention in animal nutrition is the use of plant secondary metabolites. Several studies have demonstrated the ability of certain compounds to reduce methanogenesis through different modes of action. The present review will describe in detail the characteristic of the most studied secondary metabolites that have been shown to reduce enteric methane production and their effects on fermentation parameters. Finally, it is highlights the need to identify new compounds and methodological aspects to consider are suggested.

Key words: Climate change; secondary metabolites; methane; ruminants.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un creciente interés por temas ambientales, en especial los relacionados con el

cambio climático. La ganadería es considerada como uno de los principales sectores de producción de gases de efecto invernadero (Merino et al., 2011). Estos sistemas se estiman contribuyen con cerca del

80% de las emisiones de metano (CH₄) y óxido nitroso (N₂O) de todo el sector agrícola (Havlik *et al.*, 2014), generando hasta un 9% de todas las emisiones antropogénicas de CO₂, 37-52% de CH₄ y 65-84% de N₂O (Peters *et al.*, 2012). En rumiantes, el metano es el gas que se produce en mayores cantidades (Bodas *et al.*, 2012) y presenta un potencial de calentamiento 21 veces mayor que el CO₂ (Peters *et al.*, 2012). A pesar de que la concentración del CH₄ con respecto al CO₂ es muy baja, su contribución al calentamiento global es importante. Asimismo, dado que su tiempo medio de vida atmosférica es corto, disminuciones en su concentración pueden ser notadas en corto tiempo (Colombatto, 2007; Carmona *et al.*, 2005).

El metano es producido principalmente por la descomposición bacteriana anaerobia de los compuestos orgánicos de los alimentos en el tracto digestivo de los bovinos (Merino *et al.*, 2011). Los productos de la fermentación son principalmente ácidos grasos volátiles (AGV's-acetato, propionato y butirato), formiato, etanol, lactato, succinato y ácidos grasos ramificados. De estos, los AGV's son la principal fuente de energía para el animal. También se produce amonio, hidrógenos y dióxido de carbono, estos dos últimos subproductos son reducidos y convertidos en metano por poblaciones microbiales especializadas (Jansen, 2010; Banik *et al.*, 2013). El CH₄ producido es eliminado vía eructos a la atmósfera, generando una emisión diaria que varía entre 150-420 l en el caso de bovinos o 25-55 l en ovejas (Jansen, 2010).

La producción de metano representa una pérdida energética del 2 – 12 % de la energía consumida (Johnson y Johnson, 1995) que puede ser potencialmente utilizable por el animal. Una forma de reducir estas pérdidas es a través de la manipulación de la dieta en busca de promover la eficiencia de fermentación ruminal para mejorar la utilización de los alimentos (Makkar y Vercoe, 2007). El uso de aditivos químicos y antibióticos ha sido útil para reducir las emisiones, no obstante su uso ha sido vetado en algunos países porque se considera que los microorganismos intestinales de los animales pueden generar resistencia a estos compuestos a través del tiempo, y estos podrían transmitirse a los humanos por medio de los productos de origen animal (Durmic y Blache, 2012), además en la actualidad las exigencias de los consumidores están dirigidas hacia la obtención de productos bajo un concepto “limpio, verde y ético”, es decir poco uso de drogas, hormonas o químicos, bajo impacto ambiental, considerando el bienestar animal (Bodas *et al.*, 2012; Durmic y Blache, 2012). Un área de proyección para encontrar alternativas de mitigación de metano ruminal son los metabolitos secundarios de las plantas (Bodas *et al.*, 2012; Santra *et al.*, 2012). Existen evidencias que demuestran que ciertos compuestos naturales

presentan propiedades antimicrobiales, los cuales podrían ser usados contra grupos metanogénicos en el rumen (Santra *et al.*, 2012). Compuestos como las saponinas, taninos y aceites esenciales, han demostrado reducir la producción de metano ruminal *in vitro* (Goel *et al.*, 2008; Busquet *et al.*, 2006; Tana *et al.*, 2011) e *in vivo* (Grainger *et al.*, 2009; Hess *et al.*, 2004; Jensen, 2012). La eficiencia en la reducción de la metanogénesis ruminal varía dependiendo de la concentración y tipo de metabolito presente, es por esta razón que el objetivo de la presente revisión es identificar los diferentes metabolitos secundarios que han sido reportados en la literatura por reducir la producción de metano ruminal, y conocer sus mecanismos de acción.

Propiedades antimetanogénicas de los metabolitos secundarios de las plantas

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (temperatura, humedad, intensidad de luz, sequía, etc) (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011). Entiendase por bioactivo, aquellos compuestos que tiene la capacidad de provocar efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y/o animales (Durmic y Blache, 2012). Durante muchos años estos compuestos se han usado principalmente para la fabricación de medicamentos y preservación de alimentos, sin embargo también se ha demostrado que son útiles para manipular algunos procesos metabólicos en los rumiantes y modular selectivamente las poblaciones microbianas del rumen permitiendo mejorar la fermentación, el metabolismo del nitrógeno y reducir la producción de metano (Bodas *et al.*, 2012; Patra y Saxena, 2010).

Entre los metabolitos que han demostrado influir en la producción de metano se encuentran: saponinas, taninos, compuestos organosulfurados, aceites esenciales, ligninas, alcaloides, antioxidantes etc, aunque actualmente se reportan más de 200.000 estructuras definidas de compuestos secundarios, lo que demuestra el gran escenario que aún requiere ser investigado (Santra *et al.*, 2012; Patra y Saxena, 2010).

Los metabolitos secundarios muestran diferentes mecanismos de acción para reducir la metanogénesis, pero que de manera general se asocia con una inhibición en la actividad de las bacterias arqueas metanogénicas, mejorando las reacciones metabólicas (e.g. la fermentación hacia una mayor formación de propionato reduciendo la producción CH₄), disminuyendo los H₂ disponibles para la producción de metano (e.g. otras fuentes alternativas para la eliminación de H₂) o reduciendo la fermentación

ruminal, no obstante este mecanismo no es de mucho interés ya que resulta en una menor eficiencia de utilización de los alimentos (Bodas et al., 2012).

Varios estudios han demostrado que se pueden implementar estrategias nutricionales con el uso de plantas con alta presencia de metabolitos secundarios sin llegar a afectar el desempeño de los animales. Jensen. (2012) encontró que el consumo de forrajes en pastoreo está influenciado por el tipo de metabolito secundario consumidos y la secuencia de alimentación, por ejemplo, en bovinos se observó mayor frecuencia de pastoreo cuando primero se les permitió pastorear leguminosas con contenidos ya sea de taninos o saponinas, mientras que en ovejas el consumo de forrajes con altos contenidos en alcaloides fue mayor cuando se suplementó con taninos o saponinas. Este estudio sugiere que los compuestos secundarios interactúan entre sí para influir en el consumo en pastoreo y que esta secuencia de alimentación se puede manipular. Jayanegara et al., (2012) encontraron que la combinación de plantas de alta calidad con plantas con altos contenidos de fenoles (taninos) en la dieta de rumiantes permite reducir las emisiones de metano sin afectar la fermentación en el rumen. Por otro lado, Delgado et al., (2007) sugieren que la mezcla de gramíneas con un 25% de leguminosas como *Pennisetum purpureum*, *Trichantera gigantea* y *Morus alba* mejoran el uso de la energía en los rumiantes y reducen la producción de metano entre 31 y 27 %. Durmic et al., (2010) también encontraron una amplia gama de especies de plantas leñosas perennes australianas con propiedades antimetanogénicas y las cuales podrían servir como complemento nutricional en animales en pastoreo. Por su parte Archimède et al., (2011) indican que los rumiantes alimentados con forrajes C3 y leguminosas de clima cálido se convierte en una estrategia para reducir las emisiones. Molina et al., (2013) en experimentos *in vitro* e *in vivo* demostraron que la inclusión de *leucaena leucocephala* en dietas a base de gramíneas puede reducir la emisión de metano en bovinos hasta un 8%. Rodríguez et al., (2013) evaluaron el efecto de extractos crudos vegetales de tres especies arbóreas (*Sambucu nigra*, *Tithonia diversifolia*, *Morus alba*) sobre la emisión de metano y encontraron que niveles de inclusión entre 100 y 500 ppm permitieron reducir las emisiones >20%, convirtiéndose en una alternativa viable para ser usados como aditivos en dietas para rumiantes.

A pesar de que se han identificado un gran número de compuestos bioactivos, es importante reconocer que aún faltan muchos otros compuestos por identificar ya que en muchos casos se ha podido observar la actividad biológica de la planta, sin embargo no se conocen los compuestos fitoquímicos responsables de esa actividad (Rochfort et al., 2008). Por otro lado, se

ha podido observar que los resultados positivos observados en experimentos *in vitro* no se reflejan cuando son realizados en condiciones *in vivo*, una explicación es que probablemente hay un reajuste de las poblaciones microbianas o un proceso de adaptación a los metabolitos secundarios. Esta adaptación puede estar dada por la degradación o neutralización de las moléculas activas o el desarrollo de mecanismos de tolerancia o resistencia a los compuestos, lo que podría explicar por qué en la mayoría de los estudios *in vivo* los efectos observados tienen una persistencia limitada (Bodas et al., 2012). La adaptación de los microorganismos a los metabolitos secundarios es una limitante que disminuye la efectividad en el tiempo, y para superar esta limitante se recomienda suministrarlos rotacionalmente en la dieta de los animales (Patra y Saxena, 2010).

Existe un gran número de especies de plantas con potencial para disminuir la producción de CH₄ que pueden ser usados ya sea como aditivos alimenticios, suplementos o como alimento para rumiantes en pastoreo. Los principales metabolitos secundarios con propiedades antimetanogénicas se clasifican generalmente en cuatro grupos principales: saponinas, taninos, aceites esenciales, compuestos órganosulfurados y flavonoides (Patra y Saxena, 2010).

Saponinas

Son compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. De acuerdo al carácter químico de la aglicona (conocido como sapogenina) las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides. Las esteroides predominan en las plantas y son compuestos que tiene 27 átomos de carbono que conforman la estructura central (eg. spirostanol y furostanol). Por su parte las triterpenoides están compuestas principalmente por agliconas con 30 átomos de carbono (eg. Oleanano) (Thakur et al., 2011).

Los tipos de saponinas más encontradas son las triterpenoides especialmente en leguminosas, sin embargo se puede encontrar una gran variedad de estos compuestos con diferentes propiedades biológicas dependiendo de la modificación en la estructura de su anillo y el número de azúcares adheridos (Wina et al., 2005; Patra y Saxena, 2010).

Las saponinas permiten disminuir la metanogénesis indirectamente al reducir la población de protozoarios (defaunación), los cuales están asociados a las bacterias metanógenas y cuya relación puede generar 9 – 37 % de las emisiones totales de metano (Thagaard, 2007). Estos compuestos eliminan a los

protozoarios formando complejos con esteroides en la superficie de sus membranas deteriorándolas hasta que finalmente se desintegran (Wina *et al.*, 2005). También se ha sugerido que las saponinas reducen la producción de metano por otras vías. Hess *et al.*, (2003) encontraron que la fruta tropical *Sapindus saponaria* redujo la producción de metano tanto en líquido ruminal normal como defaunado en 14 y 29 % respectivamente, demostrando que el efecto no dependió totalmente de la reducción del conteo de protozoarios Guo *et al.*, (2008) observaron una disminución en la actividad de los genes productores de metano o tasa de producción de metano por las arqueas metanogénicas por efecto de la inclusión de este metabolito. Además, es conocido que las saponinas favorecen la producción de una mayor proporción de propionato, resultando en una menor oferta de hidrógenos necesarios para la producción de metano (Patra y Saxena, 2010).

El consumo de alimento no se afecta en gran medida por la inclusión de saponinas en la dieta, sin embargo la digestibilidad y la metanogénesis dependen de la dosis (Patra y Saxena, 2010). Wei-lian *et al.*, (2005) encontraron *in vitro* que la inclusión de 0.2 g/l de saponinas redujo la producción de metano sin afectar la digestibilidad, pero cuando se suministró una dosis de 0.4 g/l, se observó una disminución en la metanogénesis como consecuencia de una menor digestibilidad de la dieta la cual pudo ser ocasionada por la inhibición del crecimiento microbiano, incluyendo las bacterias celulolíticas y hongos.

Las saponinas en general tienen un efecto menor sobre el patrón de fermentación ruminal. En muchos casos se aumenta la eficiencia ya que se disminuye la relación acetato:propionato sin afectar la degradabilidad de los sustratos, mejorando la productividad de los animales (Goel *et al.*, 2008). Wang *et al.*, (2012) encontraron que la adición de saponinas (3g/día) mejoró las ganancias de peso diarias y la eficiencia alimenticia en cabras. Este metabolito también influye en la utilización de proteína en los rumiantes, en dosis moderadas pueden reducir la utilización de proteína ruminal, aumentando el flujo de proteína duodenal y reduciendo las concentraciones de amonio en el rumen (Hart *et al.*, 2008; Rochfort *et al.*, 2008). Wei-lian *et al.*, (2005) encontraron un aumento en la masa de proteína microbiana en 18.4% y una reducción en las concentraciones de amonio en 8.3% cuando suministraron 0.4 g/l de saponinas en la dieta.

Las saponinas también son útiles para mejorar los productos de origen animal. Vasta y Luciano. (2011) consideran que el suministro de estos compuestos en la dieta de rumiantes puede reducir la acumulación de colesterol en la carne, aunque este es un área que requiere mayor investigación.

Taninos

Los taninos son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les brinda la capacidad de formar complejos principalmente con las proteínas y en menor medida con iones metal, aminoácidos y polisacáridos. Se pueden encontrar en arbustos y árboles forrajeros, leguminosas, frutas, cereales y granos (Patra y Saxena, 2011; Makkar y Becker, 2007).

Los taninos se dividen en dos grupos: hidrolizables (TH) y condensados (TC). Los TH son moléculas complejas con un poliol como núcleo central (e.g. glucosa, glucitol, ácidos quínico, quercitol, siquímico) los cuales son esterificados parcial o totalmente con un grupo fenólico, por ejemplo el ácido gálico (3, 4, 5-trihidroxi benzoico; galotaninos) o el ácido gálico dímero hexahydroxydiphenic (elagitaninos). Los grupos fenólicos restantes pueden ser esterificados u oxidados para producir más TH complejos (Patra y Saxena, 2011). Los TC o proantocianidinas, son principalmente polímeros de las unidades flavan-3-ol (epi) catequina y (epi) galocatequina, que están unidos por enlaces interflavonoides C4-C8 y C4-C6. También se encuentran presentes otros monómeros de los TC, por ejemplo las profisetinidinas, probinetidinas y proguibortinidinas. Uno de los taninos más comunes “quebracho (*Schinopsis balansae*)” es del tipo de las profisetinidinas. El número de unidades monoméricas pueden variar y esto determina el grado de polimerización de di- tri- y tetraflavonoids a oligómeros superiores, estos pueden generar una gran cantidad de estructuras químicas y producir diferentes propiedades biológicas (Patra y Saxena, 2011; Patra y Saxena, 2010).

El efecto de los taninos sobre la metanogénesis aún no se entiende completamente. Se ha encontrado que pueden inhibir el crecimiento o la actividad de los metanógenos y protozoarios del rumen por medio de mecanismos bactericidas o bacteriostáticos. También se puede afectar las bacterias celulolíticas y consecuentemente la fermentación de los carbohidratos a ácidos grasos de cadena corta, en especial la producción de acetato, de esta manera se reduce la formación de CO₂ y H₂ necesarios para la metanogénesis (Bodas *et al.*, 2012).

La actividad antimetanogénica de los taninos se atribuye principalmente a los TC los cuales disminuyen la producción de metano a través de una reducción en la digestión de la fibra. Tiemann *et al.*, (2008) evaluó el efecto de 2 leguminosas tropicales (*Calliandra calothyrsus* y *Flemingia macrophilla*) conocidas por su contenido de taninos condensados sobre la emisión de metano en corderos y encontró

una reducción en la emisión de hasta 24%, pero a causa de la reducción en la digestibilidad de la materia orgánica y fibra. Por otro lado, también se ha encontrado que los TH pueden reducir la metanogénesis mediante la inhibición de las bacterias metanógenas o de microorganismos productores de hidrógenos (Bayat y Shingfield, 2012; Bodas et al., 2012). La acción negativa de los taninos sobre los metanógenos se da porque se produce un efecto sobre las proteínas funcionales (enzimas) que están localizadas dentro o sobre los metanógenos. En general la influencia de estos compuestos es variable y al igual que muchos otros metabolitos, su efecto va a depender del tipo y la dosis en la dieta (Patra y Saxena, 2010). Concentraciones entre (2–4% MS) brinda beneficios sobre el metabolismo proteico, reduciendo la degradación a nivel ruminal y aumentando el flujo de aminoácidos que pueden ser absorbidos en el intestino delgado e incrementando el rendimiento animal sin afectar el consumo de alimento. También se favorece la salud animal, ya que en cabras se ha encontrado una reducción en el efecto de parásitos internos, y en bovinos disminuye el riesgo de timpanismo. Niveles de inclusión en la dieta superiores al 6% reducen el consumo de alimento, tasa de digestión ruminal y productividad (Aerts et al., 1999).

Los taninos reducen la degradación de la proteína en el rumen a través de la formación de complejos entre estos compuestos, previniendo el ataque por los microorganismos (Patra y Saxena, 2010), aunque el efecto antimicrobial en el rumen también afecta el crecimiento de las bacterias celulolíticas, lo que genera efectos adversos sobre la fermentación ruminal y digestión de los alimentos (Patra y Saxena, 2009). Las altas concentraciones hacen que después del enlace con las proteínas, algunos taninos quedan libres y son estos los que pueden reducir la digestión de la fibra al formar complejos con lignocelulosa previniendo la digestión microbial o inhibiendo los microorganismos celulíticos y la actividad de las enzimas fibrolíticas (Patra y Saxena, 2010).

De manera general se considera que el modo de acción de los taninos para reducir la metanogénesis es a través de la disminución en el número de protozoarios y metanógenos y por la reducción en la degradación de la fibra, sin embargo todo va a depender de la estructura química y dosis en la dieta. También, algunos taninos (especialmente los hidrolizables) pueden ser potencialmente tóxicos cuando se suministran en grandes cantidades sin un tiempo adecuado de adaptación (Patra y Saxena, 2010).

Los taninos han recibido gran atención porque permiten modificar la composición de ácidos grasos en los productos provenientes de los rumiantes (carne

o leche). Estos compuestos pueden inhibir el crecimiento de varias bacterias ruminales incluyendo las asociadas con el proceso de biohidrogenación ruminal, esta capacidad podría ser aprovechada nutricionalmente para alterar este proceso y mejorar de esta manera el contenido de ácido linoléico conjugado (CLA) en los productos. El CLA es conocido por sus efectos benéficos sobre la salud, propiedades anticancerígenas, por reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y modulación del sistema inmune (Patra y Saxena, 2011). También se ha encontrado que la suplementación con taninos en ovejas, reduce la presencia de escatol, un compuesto indólico originado en el rumen que en altas concentraciones genera un sabor fecal en la carne lo que reduce la calidad y consumo (Vasta y Luciano, 2011).

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de metabolitos secundarios volátiles lipofílicos, obtenidos a partir de fracciones volátiles de las plantas por procesos de destilación a vapor (Patra y Saxena, 2010). Estos aceites son específicos de las plantas y son responsables del sabor y fragancia. Puede existir una gran variación en la producción y composición de los aceites esenciales entre plantas de una misma especie y en diferentes partes de una misma planta. Por su parte, la composición de los aceites varía de acuerdo a la temporada del año y las locaciones geográficas (Benchaar y Greathead, 2011). Los AE presentan diversas composiciones químicas, naturales y propiedades biológicas. Los compuestos activos más importantes están incluidos en 2 grupos químicos: terpenoides (monoterpenoides y sesquiterpenoides) y fenilpropanoides, estos 2 grupos provienen de diferentes precursores del metabolismo primario y se sintetizan a través de diferentes vías metabólicas (Calsamiglia et al., 2007).

El grupo de metabolitos secundarios más numeroso y diversificado son los terpenoides, los cuales se encuentran en muchas hierbas y especias. Estos compuestos se derivan de una estructura básica de 5 carbonos (C_5H_8), comúnmente llamada una unidad de isopreno y se clasifican en función del número de estas unidades en su esqueleto. Entre los terpenoides, los componentes más importantes de la mayoría de los aceites esencial pertenecen a las familias monoterpenoide y sesquiterpenoides (Calsamiglia et al., 2007; Patra y Saxena, 2010). Por otro lado, los fenilpropanoides a pesar de no ser los compuestos más comunes en los aceites esenciales, algunas plantas los tienen en grandes proporciones, estos compuestos presentan una cadena de 3 carbonos unidos a un anillo aromático de 6 carbonos. Los fenilpropanoides se derivan principalmente de la fenilalanina (un aminoácido aromático) sintetizado

por la vía metabólica del ácido shikímico que sólo funciona en microorganismos y plantas. Los AE se pueden obtener a partir de flores, pétalos, hojas, tallos, frutos, raíces y las concentraciones depende de la etapa de crecimiento y condiciones ambientales (Calsamiglia *et al.*, 2007; Patra y Saxena, 2010).

Los AE presentan una fuerte actividad antimicrobial que inhibe el crecimiento y la supervivencia de la mayoría de microorganismos en especial de bacterias. A pesar de que los AE pueden reducir la metanogénesis ruminal, se cree que esta reducción se produce dependiendo de la dosis en la dieta. Con dosis altas se puede observar una reducción en la producción de metano, pero también se afecta la fermentación ruminal y por lo tanto la formación de otros productos finales (Bodas *et al.*, 2012; Benchaar *et al.*, 2008), sin embargo existen algunos AE que han demostrado reducir la metanogénesis entre 20-60% sin afectar la fermentación. Entre los más estudiados están: timol (tomillo), carvacrol (orégano), eugenol (clavo, canela), cinamaldehído (canela), anetol (anís, hinojo), bayas de enebro y aceite de menta (Calsamiglia *et al.*, 2007; Bodas *et al.*, 2012; Benchaar y Greathead, 2011).

El efecto de los AE sobre los microorganismos ruminales se produce dado su naturaleza lipofílica la cual genera una alta afinidad por las membranas celulares de los microbios en donde los grupos funcionales de los AE interactúan con los componentes de las membranas y como resultado se altera el transporte normal de iones (electrones) generando fallas en algunos procesos (e.g. translocación de proteínas, fosforilación, reacciones enzima dependientes), de esta manera la membrana se altera y las enzimas microbianas son inactivadas, el principal problema es que también se afecta la actividad de algunos microorganismos benéficos para la fermentación. Los AE afectan en mayor proporción a las bacterias Gram-positivas que las Gram-negativas. En general se ha encontrado que los metanógenos ruminales parecen ser afectados por los AE cuando se suministran en altas concentraciones en la dieta (Calsamiglia *et al.*, 2007; Bodas *et al.*, 2012; Benchaar y Greathead, 2011).

La disminución en la producción de metano generada por los AE parece estar mediada por una aparente reducción de los metanógenos y los microorganismos productores de hidrógeno (Patra y Saxena, 2010). También se ha observado una inhibición en bacterias productoras de amonio y otras bacterias poco deseables, lo que permite modular favorablemente la fermentación ruminal incrementado las concentraciones de ácidos grasos volátiles y reduciendo la producción de metano y amonio ruminal.

La mayoría de los resultados que se han obtenido de estudios *in vitro* e *in vivo*, indican que los beneficios obtenidos con los AE tienden a disminuir a través del tiempo dado a los cambios en las poblaciones microbianas o la adaptación de especies microbiales individuales (Patra y Saxena, 2010).

Otra característica de los AE es que también presentan propiedades antioxidantes que permiten mejorar la calidad de los productos animales. Nieto *et al.*, (2010a) encontraron que la suplementación de ovejas con hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) mejoró la calidad de la carne, el color de la grasa y redujo el olor rancio al final de un periodo de evaluación de 21 días. Resultados similares encontraron Nieto *et al.*, (2010b) con la adición de hojas de tomillo en ovejas en donde además se observaron bajos recuentos de bacterias, lo que se atribuye a la capacidad antimicrobial de los AE. También existe evidencia de la presencia de AE o sus productos metabólicos en la leche de bovinos, estas moléculas pueden ofrecer propiedades nutricionales y organolépticas específicas lo que genera un valor agregado en los productos lácteos (Chion *et al.*, 2010).

Compuestos órganosulfurados

Existen dos fuentes principales de compuestos órganosulfurados en plantas: unos derivados del sistema glucosinolato-mirosinasa (sustrato-enzima) que se encuentra en la familia Cruciferae (Brassicaceae) por ejemplo las coles, el brócoli (*Brassica oleracea*), berro (*Nasturtium officinalis*), mostaza (*Brassica juncea*), wasabi (*Wasabia japonica*), rábano picante (*A Armoracia rusticana*) y otros compuestos derivados del sistema aliina-aliinase pertenecientes a la familia Alliaceae tales como el ajo (*A. sativum*), cebolla (*A. cepa*) y puerros (*A. porrum*) (Mithen, 2006).

A pesar de que los sistemas glucosinolato-mirosinasa y aliina-aliinase son diferentes bioquímicamente y evolutivamente, existe una similitud y es que ambos sistemas tienen un sustrato no volátil espacialmente separado de una enzima glicosilada que después de la ruptura del tejido cataliza la hidrólisis del sustrato a un producto inestable que espontáneamente y / o enzimáticamente se convierte en una variedad de productos, muchos de los cuales son volátiles y tienen importantes propiedades sensoriales. Las enzimas mirosinasa y aliinasa están asociadas con proteínas como las lectinas y presentan varias isoformas de importancia biológica desconocida (Mithen, 2006).

En los sistemas aliina-aliinase y glucosinolato-mirosinasa se derivan una serie de compuesto que contiene azufre. En el primer caso, los constituyentes principales que contienen azufre son los sulfóxidos de

S-alqu(en)il-L- cisteína y γ -sulfóxidos glutamyl alqu(en)il-L- cisteína. En el segundo caso los principales metabolitos que contienen azufre se encuentran principalmente en la familia Brassica y estos varían entre las plantas de la misma familia, por ejemplo en la mostaza marrón se encuentran los Glucosinolatos de alilo y 3 butenilo, no obstante en la mostaza blanca se encuentran p-hidroxibencil glucosinolatos, mientras que en el rábano picante y wasabi se encuentran los Glucosinolatos de alilo y otros (Mithen, 2006; Patra y Saxena, 2010).

Los compuestos órganosulfurado, en particular los que se encuentran en el aceite de ajo (dialilsulfuro, disulfuro de dialilo, mercaptano de alilo y alicina), tienen un alto potencial para disminuir la producción de metano en el rumen sin afectar la fermentación. El azufre presente en estos compuestos genera una alta capacidad antimicrobiana que afecta directamente el número de bacterias metanógenas sin afectar la población de bacterias totales (Hart et al., 2008; Bodas et al., 2012). Se ha sugerido que los compuestos órganosulfurado afectan directamente a las arqueas metanogénicas del rumen a través de una inhibición de la enzima 3 - hidroxil-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA) disminuyendo la síntesis de las unidades de isoprenoides y afectando la formación de la membrana lipídica característica de las arqueas (Patra y Saxena, 2010).

Es conocido también que la adición de estos componentes en la dieta de rumiantes no afecta la degradación del sustrato y en muchos casos se ha observado una mejor digestibilidad, en particular en la degradación de la fibra, esto genera un cambio en la fermentación ruminal en donde se reduce la producción de acetato y se aumenta la de propionato, por lo que la producción total de ácidos grasos volátiles no se altera (Bodas et al., 2012).

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal, están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cáscaras de las frutas. Estos compuestos juegan un papel importante como metabolitos secundarios (Crozier et al., 2006).

Las principales clases de flavonoides son: 1) flavonas (estructuras básicas) por ejemplo: luteolina, la apigenina, diosmetina, crisoeriol, tangeretina, sinensetina, gardenin, vitexina y baicaleína; 2) flavonoles (que tiene un grupo hidroxilo en la posición 3) por ejemplo: kaempferol, quercetina, galangina, datiscetina, morin, robinetina,

isorhamnetina, tamarixetina, quercetagetina y miricetina; 3) flavanonas (enlaces saturados en las posiciones 2-3) por ejemplo: hesperetina, taxifolina, eriodictiol y naringenina; 4) flavan-3-ol por ejemplo: catequina y epicatequina; 5) isoflavonas por ejemplo: genisteína, daidzeína y coumestrol; 6) antocianidinas: cianidina, delphinidina, pelargonidina y peonidina (Patra y Saxena, 2010). La mayoría de los flavonoides se encuentran comúnmente conjugados con azúcares en forma de glucósidos, también es común encontrar grupos hidroxilo en las posiciones 4, 5 y 7 (Crozier et al., 2006; Patra y Saxena, 2010).

Las plantas que contiene flavonoides no solo reducen la producción de metano, también estimulan el metabolismo microbioal (Patra y Saxena, 2010; Bodas et al., 2012). Broudiscou y Lassalas. (2000) estudiaron el efecto de *L. officinalis* y *E. arvense* conocidas por su alto contenido de flavonoides sobre la fermentación *in vitro* por los microorganismos ruminales y encontraron que la adición de ambos extractos mejoraron la tasa de fermentación en 50% a través de un aumento de la liberación de acetato y propionato, reduciendo de esta manera la producción de metano.

Otros compuestos secundarios antimetanogénicos en plantas

En varios estudios se han encontrado un gran número de otros compuestos secundarios en plantas que han demostrado propiedades para inhibir la producción de metano y las arqueas metanogénicas (Patra y Saxena, 2010). García-González *et al.*, (2008b) encontraron que la adición de plantas con alto contenido de antraquinonas mejoró la producción de butirato y propionato y redujo la producción de metano y acetato, también se observó una baja disponibilidad de hidrógenos por lo que se supone que la primera forma de acción de estos compuestos es a través de la inhibición de las arqueas ruminales. Becker y Van Wikselaar. (2011), también encontraron que algunos antioxidantes presentes en las plantas (Catequina, 2,3-Butanedione) permitieron inhibir la producción de metano sin afectar la fermentación ruminal. Takahashi. (2011) encontró que el aceite de la cáscara de nuez de anacardo también fue útil para reducir la metanogénesis ruminal.

En la actualidad existen muchas plantas que han demostrado tener propiedades antimetanogénicas *in vitro*, pero sus principios bioactivos aún son desconocidos. Es necesario realizar evaluaciones *in vivo* a largo plazo para verificar sus efectos sobre la metanogénesis e identificar los compuestos bioactivos que participan en el proceso (Patra y Saxena, 2010).

Pasos para la evaluación del potencial antimetanogénico de plantas

La identificación de plantas con metabolitos secundarios útiles para reducir la metanogénesis ruminal es un área de investigación que aún se encuentra en sus primeras fases (Salem *et al.*, 2012). Aunque no existe una solución única para reducir las emisiones de metano en rumiantes, se considera que el uso de plantas con estas propiedades es una opción viable, especialmente para rumiantes con manejos a base de pastoreo (Buddle *et al.*, 2011; Lascano y Cárdenas, 2010), donde los animales las puedan consumir directamente y de esta forma autorregular la emisión de este gas de efecto invernadero. Esta alternativa de mitigación cobra mayor importancia en países en vía de desarrollo donde predominan los sistemas de producción ganadera a base de pastoreo y donde se generan aproximadamente tres cuartos de la emisión total de metano entérico (Aluwong *et al.*, 2011).

La efectividad de los metabolitos secundarios varía dependiendo de la fuente, tipo y nivel de la sustancia activa responsable del efecto antimetanogénico (Salem *et al.*, 2012). Para la identificación de plantas con estas propiedades, Flachowsky y Lebzien. (2012) proponen 4 fases indispensables durante el proceso metodológico: 1) caracterización botánica y composición fitoquímica, 2) caracterización analítica de la/s sustancia fitoquímica/s, 3) estudios *in vitro* para evaluar el efecto de los metabolitos sobre la fermentación y emisión de metano, y 4) estudios *in vivo* para evaluar el efecto de las plantas sobre el consumo de alimento, digestibilidad, desempeño animal y emisión de metano, con el objetivo de demostrar la eficiencia de estos compuestos para su uso a nivel comercial (Salem *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos naturales que tiene la capacidad de reducir la metanogénesis ruminal. Su efecto va a depender del tipo de metabolito, concentración en la planta, dosis y su interacción con la dieta base de los animales. Los mecanismos de acción varían dependiendo el tipo de metabolito, sin embargo se ha observado un efecto directo sobre microorganismos responsables de la metanogénesis (bacterias metanógenas y protozoarios), mejorando la eficiencia de fermentación (mayor producción de propionato) o afectando la digestibilidad de la dieta.

La identificación de metabolitos secundarios en plantas con propiedades antimetanogénicas es un área de investigación reciente, que brinda múltiples beneficios en especial a sistemas de producción con rumiantes en pastoreo. Durante el proceso de caracterización del potencial antimetanogénico es

indispensable identificar el compuesto activo responsable del efecto, estudiarlo en condiciones *in vitro* para conocer parámetros de fermentación y su efecto sobre la producción de metano, y por último evaluarlo directamente con animales para verificar el efecto antimetanogénico, garantizando no afectar el desempeño y bienestar animal.

La reducción en las emisiones de metano en sistemas ganaderos a base de pastoreo es un reto, en donde la mejor opción es la manipulación de especies de plantas que presenten compuestos bioactivos (taninos, saponinas, etc.) para que sean consumidas directamente por los animales y de esta manera implementar diferentes estrategias que permitan reducir significativa y sosteniblemente las emisiones.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira (Convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el Fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013-2015) y la universidad Nacional de Colombia Sede Orinoquia (Convocatoria de investigación para financiar trabajos de grado en posgrado en temáticas relacionadas con la Orinoquia 2014-I).

REFERENCIAS

- Aerts, R., Barry, T., McNabb, W. 1999. Review Paper: Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 75: 1–12.
- Aluwong, T., Wuyep, P. A., Allam, L. 2011. Livestock-environment interactions: Methane emissions from ruminants. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(8), pp. 1265-1269.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P., Doreau, M. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*, 166– 167: 59– 64.
- Banik, B. K., Durmic, Z., Erskine, W., Nichols, P., Ghamkhar, K., Vercoe, P. 2013. Variability of *in vitro* ruminal fermentation and methanogenic potential in the pasture legume biserrula (*Biserrula pelecinus* L.). *Crop & Pasture Science*, 64: 409–416.
- Bayat, A., Shingfield, K. 2012. Overview of nutritional strategies to lower enteric methane emissions in ruminants. *Maataloustieteen Päivät*, pp 1-7.
- Becker, P.M., Van Wikselaar, P.G. 2011. Effects of plant antioxidants and natural vicinal

- diketones on methane production, studied in vitro with rumen fluid and a polylactate as maintenance substrate. *Animal Feed Science and Technology*, 170, 201–208.
- 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.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176:78– 93.
- Broudiscou, L.P., Lassalas, B. 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*, 40:431–440.
- Buddle, B.M., Denis, M., Attwoo, G.T., Altermann, E., Janssen, P.H., Ronimus, R.S., Pinares-Patiño, C.S., Muetzel, S., Wedlock, D.N. 2011. Review Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*, 188:11–17.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., 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., Ferret, A. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90:2580–2B5.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83:2572-2579.
- Carmona, J., Bolívar, D., Giraldo, L. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol 16:1-49.
- Chion, A. R., Tabacco, E., Giaccone, D., Peiretti, P. G., Battelli, G., Borreani, G. 2010. Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and “Toma piemontese” cheese as affected by diet composition in different seasons. *Food Chemistry*, 121:393–399.
- Colombatto, D. 2007. Potencial de la Monensina para Reducir las Emisiones de Metano por parte de la Ganadería. *Revista argentina de producción animal*, pp 1 – 7.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites Occurrence Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Chennai, India, pp. 1–24.
- Delgado, D., González, R., Galindo, J., Almeida, C., Almeida, M. 2007. Potencialidad de *Trichantera gigantea* y *Morus alba* para reducir la producción ruminal de metano in vitro. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 41, No 4.
- Durmic, Z., Blache, D. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology*, 176 (2012) 150– 162.
- Durmic, Z., Hutton, P., Revell, D.K., Emms, J., Hughes, S., Vercoe, P.E. 2010. *In vitro* fermentative traits of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 160: 98–109.
- Flachowsky, G., Lebzien, P. 2012. Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 70– 77.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., González, J.S. 2008. Dose–response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 319–334.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*, 105:770–777.
- Grainger, C., Clarke, T., Auld, M. J., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M., Waghorn, G. C., Eckard, R. J. 2009. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 89: 241–251.
- Hart, K.J., Yáñez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147:8–35.
- Havlik, P., Valina, H., Herrero, M., Obersteiner, M., Schmid, E., Rufino, M. C., Mosnier, A., Thornton, P. K., Böttcher, H., Conant, R. T., Frank, S., Fritz, S., Fuss, S., Kraxner, F., Notenbaert, A. 2014. Climate change

- mitigation through livestock system transitions. Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol. 111- no, 10: 3709–3714.
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Díaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R., Machmüller, A., 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109:79–94.
- Hess, H. D., Beuret, R., Loetscher, M., Hindrichsen, I. K., Machmüller, A., Carulla, J. E., Lascano, C. E., Kreuzer, M. 2004. Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilisation of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Animal Science*, 79: 177–189.
- 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.
- Jayanegara, A., Marquardt, S., Wina, E., Kreuzer, M., Leiber, F. 2012. In vitro indications for favourable non-additive effects on ruminal methane mitigation between high-phenolic and high-quality forages. *British Journal of Nutrition*, pp1 – 8.
- Jensen, L.T. 2012. Livestock Foraging Behavior In Response To Sequence and Interactions Among Alkaloids, Tannins, and Saponins. Doctoral thesis. Utah State University, pp 1-43.
- Johnson, K. A., Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73:2483-2492.
- Lascano, C. E., Cárdenas, E. 2010. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*. Vol.39, p.175-182.
- Makkar, H. P. S., Becker, K. 2007. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. *Animal*, 1:9. pp 1371–1391.
- Makkar, H. P. S., Vercoe, P. 2007. Measuring methane production from ruminants. Joint FAO/IEA Division of Nuclear Techniques in food and Agriculture, International Atomic Energy, Vienna-Austria, pp 1-137.
- Merino, P., Ramirez-Fanlo, E., Arriaga, H., Del Hierro, O., Artetxe, A., Viguria, M. 2011. Regional inventory of methane and nitrous oxide emission from ruminant livestock in the Basque Country. *Animal Feed Science and Technology*, 166– 167: 628– 640.
- Mithen, R. 2006. Sulphur-containing compounds. In: Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.), *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing, Chennai, India, pp. 25–46.
- Molina, C.I., Angarita, E., Mayorga, O.L. 2013. Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto de la inclusión de *Leucaena leucocephala* sobre la producción de metano de dietas para bovinos basadas en gramíneas tropicales. *Memorias XII Encuentro Nacional y V Internacional de los Investigadores de las Ciencias Pecuarias ENICIP*, Medellín – Colombia, Vol 26. ISSN 0120-0690, pp 442.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., Garrido, M.D. 2010 a. Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): influence on lamb meat quality. *Meat Science*, 84, 23–29.
- Nieto, G., Díaz, P., Bañón, S., Garrido, M.D. 2010 b. Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis ssp. gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science*, 85:82–88.
- Patra, A., Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71:1198–1222.
- Patra, A., Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 96: 363–375.
- Patra, A., Saxena, J., 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 24–37.
- Peters, M., Rao, I., Fisher, M., Subbarao, G., Martens, S., Herrero, M., Van der Hoek, R., Schultze-Kraft, R., Miles, J., Castro, A., Graefe, S., Tiemann, T., Ayarza, M., Hyman, G. 2012 . Tropical Forage-based Systems to Mitigate Greenhouse Gas Emissions. Chapter 11, *Eco-Efficiency: From Vision to Reality.*, pp 172-190.
- Ramakrishna, A., Aswathanarayana, G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plants Signaling & Behavior*, 6:11, 1720-1731.
- Rochfort, S., Parker, A., Dunshea, F. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69:299–322.
- Rodríguez, T.A., Mancipe, E.A., Maestra, L.I., Vasquez, D.R., Avellaneda, Y., Ariza, C.J., Mayorga, O.L. 2013. Efecto de la adición de extractos crudos vegetales de *Sambucu nigra*, *Tithonia diversifolia* y *Morus alba* sobre la producción de gas total y metano bajo condiciones anaerobias *in vitro*. *Memorias XII Encuentro Nacional y V*

- Internacional de los Investigadores de las Ciencias Pecuarias ENICIP, Medellín – Colombia, Vol 26. ISSN 0120-0690, pp 433.
- Salem, A.Z.M., López, S., Robinson, P.H. 2012. Plant bioactive compounds in ruminant agriculture – Impacts and opportunities. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 1–4.
- Santra, A., Saikia, A., Baruah, K.K. 2012. Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production. *Journal of Pharmacognosy*, Vol 3, Issue 2, pp.-115-120.
- Takahashi, J. 2011. Some prophylactic options to mitigate methane emission from animal agriculture in Japan. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24, 285–294.
- Thakur, M., Melzig, M.F., Fuchs, H., Weng, A. 2011. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. *Botanics: Targets and Therapy* 1 : 19–29.
- Tana, H. Y., Sieoa, C. C., Abdullaha, N., Lianga, J. B., Huanga, X. D., Hoa, Y. W. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 169: 185– 193.
- Thagaard, C. 2007. The abundance and diversity of methanogens and their association with ciliates. Tesis Doctoral. University of Western Australia, pp 17 – 20.
- Vasta, V., Luciano, G. 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research*, 101:150–159.
- Wang, J., Ye, J., Liu, J. 2012. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. *Tropical Animal Health and Production*, 44:697–706.
- Wei-lian, H., Yue-ming, W., Jian-xin, L., Yan-qiu, G., Jun-an, Y. 2005. Tea saponins affect *in vitro* fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 6: 787–792.
- Wina, E., MuetzeL, S., Becker, K. 2005. The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Productions A Review. University of Hohenheim - Germany, Indonesian Research Institute for Animal Production – Indonesia.

Submitted November 26, 2014 – Accepted December 16, 2014