

Plantas medicinales con efecto promotor del crecimiento de los rumiantes

La nueva normativa europea sobre el uso de aditivos en la alimentación animal (Reglamento CE 1831/2003) ha supuesto la retirada, desde enero del año 2006, de los antibióticos promotores de crecimiento (APC). Esta medida responde a un principio de precaución, motivado por el aumento observado desde hace años en las resistencias bacterianas a los antibióticos, con el objeto de reducir el uso global de estos medicamentos tratando de preservar su efectividad en medicina terapéutica.

Rubén García González, Secundino López Puente y Jesús S. González Álvarez • Dpto. de Producción Animal. Universidad de León

No cabe duda de la conveniencia de reemplazar los APC con otros aditivos para salvaguardar la rentabilidad del sector productor al tiempo que se cumplen los criterios de seguridad alimentaria, respeto medioambiental y sostenibilidad

Consecuencias y oportunidades de la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento

Los APC han jugado un papel muy relevante en los sistemas intensivos de producción animal de prácticamente todas las especies. Estos sistemas, en gran parte, han podido ser implantados gracias a que se contaba con estos aditivos y muchos aspectos del manejo actual (como las raciones de los rumiantes casi carentes de forrajes, o la densificación de los lotes de animales) han sido más fáciles de implantar al incluir APC, ya que los efectos negativos de estas prácticas (acidosis ruminal, enfermedades infecciosas, etc.) son atenuados con los APC, mientras se consiguen maximizar los índices de crecimiento y rentabilidad.

No cabe duda de la conveniencia de reemplazar los APC con otros aditivos para salvaguardar la rentabilidad del sector productor al tiempo que se cumplen los criterios de seguridad alimentaria, respeto medioambiental y sostenibilidad, que están siendo marcados por la demanda social y legal. En este contexto, recientemente ha surgido un creciente interés por la investigación de productos alternativos, como los aditivos de origen vegetal. En nuestro laboratorio se han desarrollado proyectos de investigación para el estudio de plantas medicinales o sus extractos como nuevos aditivos zootécnicos sustitutivos de los APC para los rumiantes. El efecto de los APC en estos animales está basado en una inhibición selectiva de la flora bacteriana del rumen implicada en acciones digestivas de menor interés desde el punto de vista productivo, como la producción de metano o la degradación de la proteína alimentaria, con lo que se logra aumentar la energía y los nutrientes del alimento que son aprovechados por el animal, de ahí que se hable de un efecto "promotor del crecimiento". De los APC empleados en rumiantes, los ionóforos, y en concreto la monensina sódica, han sido los más empleados. Es por eso que este antibiótico ha sido el modelo empleado como referencia a imitar en nuestros estudios.

En una primera fase de trabajo, se realizó una selección empleando cultivos *in vitro* que permitió el análisis de los efectos de más de 200 productos vegetales sobre varios parámetros de la fermentación ruminal, constituyendo el trabajo más amplio de los publicados hasta este momento en la bibliografía especializada. El trabajo realizado en esta primera fase demostró que esta metodología es válida para la identificación de plantas que pudiesen tener interés para el desarrollo de aditivos zootécnicos. Con esta me-



todoología fue posible determinar, por primera vez, que tanto las raíces de *Rheum officinale* / *Rheum palmatum* (ruibarbo) como la corteza de *Frangula alnus* (frángula) podrían contener metabolitos secundarios inhibidores de la producción de metano en el rumen. En una segunda fase se realizaron diversos trabajos *in vitro* e *in vivo* para la validación y caracterización de los efectos de ruibarbo y frángula en el rumen. A continuación se presenta un resumen de los métodos empleados y los resultados obtenidos.

Pruebas experimentales

El trabajo se realizó en cuatro fases: 1) selección de las plantas y extractos; 2) caracterización *in vitro* de los efectos de las plantas seleccionadas; 3) estudio de los efectos de estas plantas en fermentadores simuladores del rumen; 4) estudio de los efectos estas plantas al ser administradas a animales.

1) Selección

El objetivo de esta fase fue la identificación de plantas medicinales que pudiesen tener interés como aditivos para la manipulación de la fermentación ruminal. Para esto, se emplearon un total de 167 plantas medicinales, 41 extractos de plantas y 22 aceites esenciales, como aditivos en cultivos ruminales *in vitro* de 24 h. Los cultivos se desarrollaron en un medio líquido anaerobio de 50 ml, empleando 450 mg de dieta más la cantidad de aditivo: 70 mg de las plantas, 40 μ l de los extractos y dos dosis de los aceites: 40 μ l y 25 μ l. Los parámetros considerados para la selección de estos aditivos fueron la producción de gas de la fermentación, metano y ácidos grasos volátiles (AGV), y la degradación de materia seca (MS) y fibra neutro detergente (FND) de la dieta. Los aceites esenciales tuvieron efectos inhibitorios sobre la fermentación, especialmente dos de ellos (*Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*). La dosis mayor de los aceites produjo una inhibición de la fermentación, mientras la dosis menor causó una disminución de la degradación de la dieta y de la producción de AGV y gas, pero la proporción de metano en el gas no decreció de manera importante. Además, la relación acetato/propionato no disminuyó según lo esperado cuando la producción de metano es inhibida. La mayoría de los extractos ensayados produjeron un aumento en los productos de fermentación, probablemente debido a su contenido en glicerina; por tanto los efectos que pudiesen ser debidos a los principios activos fueron difíciles de interpretar. De las plantas, cuatro de ellas: raíz de *Rheum officinale* x

R. palmatum (ruibarbo), corteza de *Frangula alnus* (frángula), bulbo de *Allium sativum* (ajo) y raíz de *Potentilla erecta* (tormentilla), limitaron la producción de metano. Los resultados obtenidos con ruibarbo y frángula fueron especialmente interesantes, por lo que estas dos últimas plantas fueron las seleccionadas para las siguientes pruebas experimentales.

2) Caracterización *in vitro* de los efectos del ruibarbo y la frángula

El objetivo de las distintas pruebas experimentales agrupadas en esta fase fue la caracterización de los efectos de la frángula y el ruibarbo cuando se emplearon como aditivos en fermentaciones ruminales *in vitro*. Se valoró cómo estos aditivos afectaron la digestibilidad *in vitro* de diferen-

tes dietas, en un sistema ANKOM-Daisy. A una dosis de 0,375 g/l, estas plantas no provocaron cambios en la degradabilidad de las dietas ensayadas. En cambio, las dosis de 1,4 g/l de ambas plantas causaron ligeros descensos significativos en la degradación de algunos alimentos. No obstante, la monensina sódica, empleada como control positivo a una dosis 10 μ M, indujo una inhibición de la degradación más acusada que la de las plantas.

También se estudió si los efectos producidos por estos

aditivos eran dependientes de la dosis. Así, se ensayaron dosis de ambas plantas hasta alcanzar concentraciones en el medio de 0,50; 0,95; 1,40 y 1,85 g/l (nombradas como dosis 5, dosis 9, dosis 14, y dosis 18) en cultivos *in vitro* de 24 h. Con ambas plantas se observaron cambios similares en la fermentación: un descenso acusado (mayor según aumentaba la dosis) de la producción de metano y de la relación acetato/propionato. Estos efectos fueron acompañados, a las dosis más altas, por un descenso de la producción de gas, de la degradación de la FND y de la producción de AGV. Las dosis 5 y 9 causaron en este sistema un descenso significativo de la producción de metano, mientras el resto de parámetros fermentativos no fueron afectados significativamente. En los cultivos tratados con estas plantas decreció el índice de recuperación de hidrógeno, lo que podría indicar una acumulación de hidrógeno molecular en respuesta a un efecto primario de estos aditivos inhibiendo a las arqueobacterias metanogénicas.

En otra serie de pruebas experimentales, se emplearon dos dietas diferentes (variando las proporciones de forraje: cereal y, por tanto, los contenidos de FND y almidón de la dieta), para estudiar si los cambios fermentativos y la actividad microbiana eran afectados por estos aditivos de manera diferencial según la naturaleza



Frangula alnus (frángula)

de la dieta. Los cambios producidos en la fermentación fueron coincidentes con los previamente observados, siendo similares con ambas dietas. También se realizaron cultivos *in vitro* discontinuos de larga duración (144 h), para obtener la cinética de producción de gas. Las curvas ajustadas de producción de gas de los cultivos suplementados con frángula o ruibarbo mostraron que el ritmo y volumen de gas producidos decrecieron en esos cultivos, pero siempre fueron mayores que los de las curvas de monensina sódica. Adicionalmente, la degradación de la dieta en esos cultivos fue disminuida en menor proporción que el descenso observado en la producción de gas, indicando probablemente un cambio en la estequiometría de la fermentación (menor producción de gas).

También se estudió la adaptación de los microorganismos que fuesen afectados por estos aditivos, realizando cultivos en serie sucesivos, empleando como parámetros fermentativos indicadores las producciones de gas, metano y AGV. Se observaron efectos interesantes de ambas plantas. La metanogénesis fue inhibida sostenidamente durante la duración de los cultivos (14 días) mientras que, sorprendentemente, la relación acetato/propionato producidos en esos cultivos fue aumentado progresivamente con los días, debido a una mayor producción de acetato. Estos resultados podrían corresponder con un incremento en la acetogénesis reductora.



Los recuentos de bacterias totales y celulolíticas, realizados por el procedimiento del número más probable, de cultivos tratados con las plantas y cultivos control, no fueron estadísticamente diferentes, mientras que la degradación de la MS y FND de los cultivos con frángula y ruibarbo fue sensiblemente menor. Ésto podría indicar que estos aditivos no afectan directamente a la viabilidad de estas bacterias, pero es probable que sufran un impedimento metabólico indirecto (posiblemente debido a la acumulación de hidrógeno en el medio).

En conclusión, los resultados de los trabajos experimentales realizados en esta fase parecen indicar que la frángula y el ruibarbo ejercen una inhibición primaria de la producción de metano.

3) Efectos del ruibarbo y la frángula en fermentadores simuladores del rumen

Se empleó un sistema de fermentación continua (RUSITEC) para estudiar los efectos del ruibarbo y la frángula como aditivos modificadores de la fermentación de una dieta compuesta por 800 g/kg forraje (alfalfa, heno de prado y paja de cebada: 44:44:12) y 200 g/kg concentrado (cebada), con contenidos en FND, fibra ácido detergente (FAD) y proteína bruta (PB) de 929, 566, 313 y 102 g/kg MS, respectivamente. Se emplearon simultáneamente 16 vasijas de fermentación, en una prueba experimental que se prolongó durante 19 días. En cada vasija se aportaron diariamente 16 g de MS de dieta. Las vasijas suplementadas con ruibarbo o frángula cuatro por aditivo recibieron 1 g/día del aditivo, incluido dentro de una bolsa microporosa de poliéster (esto es, 62,5 mg aditivo/g dieta, o 1,66 g/l de medio). Otras cuatro vasijas recibieron diariamente monensina sódica (control positivo) a una dosis 12 μ M, las cuatro vasijas restantes no recibieron ningún tratamiento (control). La monensina indujo cambios coincidentes con lo habitualmente indicado en la bibliografía: la producción total de metano y la proporción de metano en el gas disminuyeron, por término medio, un 23%, mientras que la relación acetato/propionato disminuyó un 33% y la producción de butirato disminuyó un 18%, en relación con el control. El ruibarbo causó un descenso significativo de la producción total de metano (-14%) y de la proporción de metano en el gas (-19%), junto con ligeros cambios en el perfil de los AGV producidos: una menor relación acetato/propionato y una mayor producción de butirato. Estos cambios fueron más pronunciados tras unos días de tratamiento, y luego se mantuvieron estables hasta el fin de la prueba experimental, indicando que no se produciría (a medio plazo) una adaptación de la población microbiana afectada por este aditivo. Los cambios inducidos por frángula fueron menos consistentes, pero siguieron la misma tendencia que los observados con ruibarbo. Debido a que ambas plantas contienen derivados antraquinónicos como metabolitos secundarios característicos, parece probable que sean estos compuestos los responsables de los efectos observados (y que la concentración de estos compuestos sea menor en la frángula o sean de diferente naturaleza química que en el ruibarbo; una dosis mayor de frángula probablemente habría producido efectos más claros). Esta hipótesis es avalada al considerar que la antraquinona ha sido empleada en el pasado por otros autores como aditivo en cultivos *in vitro*, y los efectos observados fueron similares a los aquí observados con estas plantas. La acumulación de hidrógeno y la mayor producción de butirato observada con la antraquinona, pero no con la monensina, sugerirían que el mecanismo de acción de ambos compuestos es diferente. Las antraquinonas, en contraste con la monensina, podrían inhibir directamente

la actividad de las arqueobacterias metanogénicas. Los beneficios productivos del empleo de monensina y otros ionóforos en el ganado vacuno se han atribuido fundamentalmente a los efectos ruminales inducidos por este aditivo. Nuestros resultados muestran que los metabolitos secundarios de las plantas empleadas (especialmente ruibarbo) podrían causar cambios similares en la fermentación ruminal. El uso de estos compuestos en las dietas de los ruminantes podría conllevar beneficios productivos y medioambientales, debidos fundamentalmente a la menor producción de metano en el rumen.

4) Empleo del ruibarbo y la frángula como aditivos: efectos sobre la ingestión y la digestión en ganado ovino

Los trabajos agrupados en esta fase se realizaron para evaluar la efectividad de estas plantas medicinales en la modulación de la fermentación del rumen, y sus efectos digestivos, cuando se emplean como aditivos en la dieta del ganado ovino. Los trabajos realizados se pueden dividir en tres bloques, según sus objetivos específicos: 4.1) pruebas experimentales para evaluar posibles cambios en el patrón de fermentación en el rumen; 4.2) pruebas experimentales para estudiar cómo estos aditivos afectan a la ingestión y palatabilidad del alimento; 4.3) pruebas experimentales para valorar el efectos de los aditivos sobre la digestibilidad del alimento.

4.1) En las primeras pruebas se emplearon 15 ovejas provistas de una cánula ruminal y mantenidas en pastoreo. Cinco animales fueron asignados a cada uno de tres grupos experimentales: control, frángula y ruibarbo. Los animales de los grupos ruibarbo y frángula recibieron 30 g/día del aditivo correspondiente, administrado diariamente a través de la cánula ruminal. Tras dos semanas de adaptación se inició la administración de los aditivos en los animales correspondientes y el periodo experimental comenzó tras tres semanas de administración. Durante el periodo experimental se realizaron distintos ensayos: toma de muestras del rumen para determinar los parámetros de fermentación, realización de cultivos *in vitro* de corta y de larga duración y pruebas de digestibilidad *in situ* de distintos alimentos. En los animales del grupo ruibarbo se observó una mayor concentración ruminal de AGV totales, acetato y butirato, y una menor concentración de ácidos grasos ramificados y pH. Al incubar *in vitro* diversos alimentos con líquido ruminal de los animales de cada grupo experimental, la producción de metano fue menor en cultivos inoculados con líquido ruminal de animales del grupo ruibarbo que la de los animales del grupo control, y la cinética de producción de gas *in vitro* resultó en menores producciones totales de gas, pero producido a un ritmo comparable a la del grupo control. En los animales de este grupo, la degradación ruminal de los alimentos no fue estadísticamente afectada, aunque se pudo observar una tendencia a una menor degradación de la FND. Los resultados de los animales del grupo frángula fueron menos consistentes.

4.2) La palatabilidad de las dietas suplementadas con es-



tas plantas fue evaluada ofreciendo simultáneamente, a ovejas no fistuladas, dos opciones a elegir: pienso completo solo, o pienso completo suplementado con frángula o ruibarbo (30 g/día) (cuatro animales por aditivo). Los animales prefirieron invariablemente el alimento sin aditivo, indicando una menor palatabilidad de los alimentos suplementados. Para estudiar si la ingestión voluntaria de los animales era afectada por los aditivos, se emplearon 20 ovejas no fistuladas, que se dividieron en cuatro grupos: control, monensina, frángula y ruibarbo. Se les administró pienso completo *ad libitum* (más 30 g aditivo/animal/día, en los grupos correspondientes; o 0,03 g monensina/kg alimento). No se observaron diferencias significativas en la ingestión voluntaria de los animales de los grupos frángula, ruibarbo y control, mientras que los animales del grupo monensina consumieron menor cantidad de alimento.

4.3) La digestibilidad aparente de una dieta de pienso compuesto completo, ofrecida a 25 g MF/kg PV, se valoró empleando ovejas no fistuladas (cuatro animales por grupo: control; monensina, 0,03 g/kg alimento; frángula, 30 g/día; ruibarbo, 30 g/día). No se observaron diferencias estadísticas entre los grupos en la digestibilidad de ninguna de las fracciones químicas consideradas (MO, FND, FAD, PB).

Conclusiones

Estos resultados muestran por primera vez que el ruibarbo y la frángula pueden modular efectivamente la fermentación del rumen cuando se emplean como aditivos en la dieta, disminuyendo a largo plazo la producción de metano, sin que se produzcan efectos adversos importantes sobre la digestión e ingestión de los alimentos. Los derivados antraquinónicos que contienen tanto ruibarbo como frángula son probablemente los principios activos responsables de los efectos observados. Muchas de estas moléculas han sido aisladas y están disponibles comercialmente, lo que abre nuevas perspectivas para el desarrollo de nuevos aditivos eficaces como sustitutos de los APC.

Las personas interesadas son invitadas a contactar con los autores para obtener información ampliada y referencias bibliográficas sobre el tema.