

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EVALUACIÓN DE FUENTES NATURALES DE FOSFATIDILCOLINA,
LISINA Y METIONINA DE SOBREPASO EN GANADO LECHERO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

M. en C. NORA IDOLINA ORTEGA ÁLVAREZ

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR: DR. GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

CO DIRECTOR: DR. ADRIAN GLORIA TRUJILLO

ASESOR: DR. JOSÉ ANTONIO MARTÍNEZ GARCÍA

**EVALUACIÓN DE FUENTES NATURALES DE FOSFATIDILCOLINA, LISINA Y
METIONINA DE SOBREPASO EN GANADO LECHERO**

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité Tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORAL:

**Director
Dr. Germán David Mendoza Martínez**



**Co Director
Dr. Adrian Gloria Trujillo**



**Asesor
Dr. José Antonio Martínez García**



DEDICATORIA

“Al creador porque sin su soplo de vida nada podría ocurrir”

A mi familia de sangre, familia de corazón, familia académica, familia de trabajo, familia por elección, a ellos con quienes decidí compartir éstos 4 años de educación.

A mis queridas Clari y Ale porque al mirarme en sus ojitos me dan la fortaleza, la alegría, el entusiasmo y el compromiso de ser una mejor persona y contribuir en su aspiración.

A todos los que creyeron en mí en este proyecto académico y me compartió su luz para poder recorrer este camino, algunas veces pavimentado, con baches, en línea recta, con subidas y bajadas, empedrado, con lluvia, sin rumbo fijo, pero al final llegando a la meta con satisfacción.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por permitirme ser parte de su comunidad y brindarme, a través de sus docentes, enseñanzas académicas y profesionales.

A las diferentes instituciones educativas que colaboraron con el desarrollo metodológico de la investigación, Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Universidad Autónoma del Estado de México Amecameca, Universidad Nacional Autónoma de México,

A mi asesor de tesis Dr. Germán David Mendoza Martínez e integrantes de mi comité tutorial Dr. Adrián Gloria Trujillo y Dr. José Antonio Martínez García, así como en su momento Dr. José Ricardo Bárcena Gama por la dirección y acompañamiento en mis distintos procesos intelectuales que han contribuido en mi formación académica.

Al Ing. Víctor Pasqualli por la confianza y facilidades en la unidad de producción lechera que dirige, pieza fundamental para el desarrollo del presente trabajo, así como a todo el personal del establo que labora y que recuerdo con mucha gratitud.

A mis profesores y mentores Dr. Fernando X. Plata Pérez, Dr. Enrique Espinosa Ayala, Dr. Pedro Abel Hernández García, Dr. Jorge Castañeda Gómez del Campo, Dr. Daniel Martínez, Dr. Augusto César Lizarazo Chaparro, por colaborar en mi proceso de aprendizaje.

A mis colegas y amigos por su aportación con un granito de arena en el logro de mis objetivos académicos y personales, Isabel, Verónica, Vicky, Valeria, Nayeli, Diana, Dulce, Gabriela, Karen, Mayra, Lucero, Óscar, César, Pablo, Mariela, Edén, Edith, gracias!.

Por último, a los ingenieros que conforma la empresa Madero Equipos de Ordeño por la capacitación y desarrollo de habilidades para el manejo de sus unidades.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE GENERAL	IV
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	5
OBJETIVO.....	6
CAPÍTULO 1. RESPUESTA PRODUCTIVA DE GANADO LECHERO A POLIHERBALES.....	8
CAPÍTULO 2. IMPACTO ECONÓMICO DEL USO DE MEZCLAS POLIHERBALES CON FOSFADITILCOLINA, LISINA Y METIONINA EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y SALUD DE VACAS LECHERAS	59
CONCLUSIONES GENERALES.....	78
REFERENCIAS	80

RESUMEN

El objetivo de este experimento fue evaluar mezclas herbales de colina, lisina y metionina en vacas lecheras sobre la producción de leche, los cambios en su composición, variaciones en el peso vivo y la incidencia de enfermedades durante 90 días de lactancia. Cien vacas Holstein multíparas (peso vivo inicial: 539 ± 19.03) fueron alimentadas con una dieta basal (18.3% PC, 1.6% PD y 1.35 Mcal / kg ENI) de heno de alfalfa, ensilaje de alfalfa, maíz rolado y concentrado (48% de forraje, 52% de concentrado). Después del parto (30 días), veinte vacas fueron asignadas aleatoriamente a tratamientos experimentales (g/d de pellet con BioCholine, OptiMethionine y OptiLysine), que recibieron: (0, 0, 0), (20, 0, 0), (40, 0, 0), (20, 20, 40) y (40, 40, 80) respectivamente. El experimento se llevó a cabo durante 90 días con mediciones diarias de la producción de leche. El análisis inicial de la información indicó que los grupos que recibieron 40 g de BioCholine tuvieron un aumento de 2.3% en la leche mientras que los 20 g de BioCholine con aminoácidos mejoraron 1.74% pero otros tratamientos no mostraron respuesta. El peso vivo mejoró en un 17% en las vacas con 40 g de BioCholine. El rendimiento reproductivo no se vio afectado por la suplementación de herbales, pero se redujo la incidencia de enfermedades en el grupo con 40 g de BioCholine. Se observó un problema de consumo de pellets debido a los compuestos volátiles presentes en los productos herbales; por lo tanto, se realizó un segundo análisis de datos incluyendo solo a las vacas que consumieron pellet. A partir del segundo análisis se concluyó que la suplementación con 40 g/d de BioCholine es una alternativa para mejorar la producción de leche y el balance energético en vacas lactantes.

ABSTRACT

The objective of this experiment was to evaluate herbal choline, methionine and lysine mixtures in dairy cows on milk production, milk composition, live weight changes, and incidences of diseases during 90 days of lactation. One hundred multiparous Holstein cows (initial body weight 539 ± 19.03 were fed a basal diet (18.3% CP, 1.6% DP and 1.35 Mcal/kg NEI) of alfalfa hay, alfalfa silage, rolled corn and concentrate (48% forage, 52% concentrate)). After calving (30 days), twenty cows were randomly assigned to experimental treatments (g/d in pellet of BioCholine, OptiMethionine, OptiLysine), which consisted in: (0, 0, 0), (20, 0, 0), (40, 0, 0), (20, 20, 40) and (40, 40, 80). The experiment was conducted for 90 days with daily measurements of milk production. Initial analysis of information indicated that the groups receiving 40 g of BioCholine had a 2.3% increase in milk while the 20 g of BioCholine with amino acids improved 1.74% but other treatments did not show response in milk. Live weight was improved by 17% in cows with 40 g BioCholine. Reproductive performance was not affected by herbal supplementation. Number of cows which some disease was reduced in group with 40 g BioCholine. There was a problem of pellet consumption due to the volatile compounds present in the herbal products; therefore, a second analyses of data were conducted using data from cows that consumed pellets and it was concluded that supplementation with herbal 40 g/d of BioCholine is an alternative to improve milk production and energy balance in lactating cows.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de las fuentes de colina se degradan en el rumen, pero BioCholine tiene una resistencia natural según los resultados de experimentos con corderos en crecimiento (Godínez-Cruz *et al.*, 2015). La suplementación con colina con una fuente protegida de la degradación ruminal ha reducido los problemas de cetosis y ha aumentado la producción de leche alrededor de un 7% (Baldi y Pinotti, 2006). Santos y Lima (2009) indicaron que la colina protegida en el rumen (RPC) ha aumentado la producción de leche en un 6%, ha mejorado el estado energético durante el posparto y ha reducido las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos libres. Mohsen *et al.* (2011) utilizaron colina protegida y observaron que la producción de leche se incrementó de 8 a 14% con 15 gramos por día y Xu *et al.* (2006) reportaron incrementos de rendimiento con 30 gramos, pero con dosis superiores a 60 gramos la producción se vio afectada negativamente. En un metaanálisis de los efectos de la colina protegida en el rumen sobre la producción de leche en vacas lecheras, Pinotti *et al.* (2010) concluyen que con 10 gramos de RPC se puede encontrar un efecto positivo sobre la producción de leche y el contenido de proteína de la leche, pero no sobre el contenido de grasa de la leche. Sin embargo, la colina a base de hierbas no se ha evaluado en ganado lechero.

Se ha reconocido que la lisina (Lys) y la metionina (Met) son los dos aminoácidos más limitantes en las vacas lecheras lactantes (NRC, 2001). Las fuentes herbales de Lys y Met son una alternativa en la formulación de la ración de ganado lechero para mejorar la producción de leche y cumplir con el flujo duodenal de Lys y Met (NRC, 2001).

El ganado lechero tiene una alta demanda de metilación durante la lactancia; por lo tanto, una suplementación combinada de colina y metionina puede mejorar su desempeño productivo. La metionina juega un papel central en la síntesis de lipoproteínas en el hígado como el intermedio clave en la transferencia de grupos metilo (Lobley *et al.* 1996) y juega otro papel importante a través del metabolismo de la carnitina. La L-carnitina se sintetiza a partir de la metionina, necesaria para que se oxide el transporte de ácidos grasos de cadena larga a las mitocondrias (Harpaz, 2005). Se ha sugerido que la metionina protegida es una posible alternativa a la colina protegida para suplementar las vacas lecheras en transición porque la metionina y la colina sirven como donantes de metilo que se utilizan en la síntesis de fosfatidilcolina a partir de fosfatidiletanolamina (Grummer, 2013).

Teniendo en cuenta la información sobre colina, lisina y metionina, este experimento se basó en la hipótesis de que el uso combinado de aditivos herbales de Indian Herbs® durante la lactancia temprana en vacas Holstein mejorará el rendimiento general reduciendo la cetosis, mejorando la producción de leche, reduciendo el balance energético con un mejor parámetro reproductivo y estos serán evaluados con el sistema computarizado de manejo de rebaños lecheros MDS-Milk® en un hato comercial.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Será posible mejorar los parámetros productivos de vacas postparto con fuentes herbales de fosfatidilcolina, lisina y metionina?

¿Podrán estas mezclas poliherbales tener alguna incidencia en la salud del ganado?

¿Cuáles serán las dosis recomendables de las mezclas herbales con fosfatidilcolina, lisina y metionina para su uso rentable en la alimentación de ganado lechero?

OBJETIVO

Evaluar si existe respuesta en ganado lechero a mezclas polihierbales nutraceuticas y estimar las dosis óptimas que permitan su uso en dietas de vacas en lactación.

PUBLICACIÓN

Ortega ANI, GD Mendoza M, R Bárcena G, PA Hernández G, E Espinosa A, JA Martínez G, A Gloria T. 2020. Economic impact of polyherbal mixtures containing choline, lysine and methionine on milk production and health of dairy cows. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2020. 32(12): 864-870. doi: 10.9755/ejfa.2020.v32.i12.2219

CAPÍTULO 1. RESPUESTA PRODUCTIVA DE GANADO LECHERO A POLIHERBALES

RESUMEN

El objetivo fue evaluar mezclas poliherbales que aportan conjugados de colina (BioCholine, BC), lisina (OptiLysine, L) y metionina (OptiMethionine, M) sobre las variables de producción en vacas lecheras. Se asignaron al azar ochenta vacas Holstein posparto. Los pellets que no contenían (Control, C, 20 vacas) y que contenían productos poliherbales (g/d) (BC20, 19 vacas; BC40, 17 vacas; BC20 + L40 + M20, 12 vacas y BC40 + L80 + M40, 12 vacas) fueron ofrecidos a las vacas durante el ordeño en un periodo de 90 días. La producción de leche no se vio afectada ($P > 0.05$) por la suplementación de mezclas herbales. Numéricamente las vacas que recibieron BC20 produjeron 0.660 kg más al día que las vacas C. La combinación con aminoácidos herbales (20, 40, 20) (40, 80, 40) redujeron la producción de leche en más de 1 kg/d. Numéricamente, 40 g de BioCholine redujeron la grasa y los aminoácidos herbales (20, 40, 20) la grasa y la proteína mostraron un incremento relativo del 1%. La tasa de gestación y el número de servicios (parámetros reproductivos) fueron similares entre los tratamientos. En conclusión, la suplementación con BC40 permite mejorar la producción de leche y el balance energético en vacas lactantes.

Palabras clave: Aditivos herbales; Producción de leche; Vacas lecheras.

ABSTRACT

The objective was to evaluate polyherbal mixtures that provide conjugates of choline (BioCholine, BC), lysine (OptiLysine, L) and methionine (OptiMethionine, M) on the production variables in dairy cows. Eighty postpartum Holstein cows were randomized. The pellets that did not contain (Control, C, 20 cows) and that contained polyherbal products (g / d) (BC20, 19 cows; BC40, 17 cows; BC20 + L40 + M20, 12 cows and BC40 + L80 + M40, 12 cows) were offered to the cows during milking for 90 days. Milk production was not affected ($P > 0.05$) by the supplementation of herbal mixtures. Numerically, the cows that received BC20 produced 0.660 kg more per day than the C cows. The combination with herbal amino acids (20, 40, 20) (40, 80, 40) reduced milk production by more than 1 kg / d. Numerically, 40 g of BioCholine reduced fat and herbal amino acids (20, 40, 20), fat and protein showed a relative increase of 1%. The pregnancy rate and the number of services (reproductive parameters) were similar between the treatments. In conclusion, supplementation with BC40 improves milk production and energy balance in lactating cows.

Keywords: Dairy cows, Herbal additives, Milk production.

INTRODUCCIÓN

Los aditivos herbales para ganado pueden representar un medio alternativo para mejorar la salud y la producción en el ganado lechero, pero es necesario identificar productos eficaces, dosis adecuadas y condiciones óptimas para obtener los beneficios (Frankič *et al.*, 2009). Algunas mezclas de poliherbales con conjugados de colina (Cañada *et al.*, 2018) y metionina herbal han mejorado la producción de leche en el ganado lechero (Mendoza *et al.*, 2020) pero no hay información de los herbales con lisina o sus combinaciones.

Los aditivos herbales disponibles consisten en extractos, mezclas de plantas o mezclas de partes específicas de estas plantas. Las plantas completas contienen la mayor cantidad de moléculas o nutrientes que son activamente responsables de sus efectos biológicos (Frankič *et al.*, 2009). Ciertos estudios que complementan mezclas de hierbas para ganado lechero han demostrado algunos efectos sobre la fermentación ruminal sin impactos significativos en la producción de leche (Lejonklev *et al.*, 2016; Kolling *et al.*, 2018) mientras que en otros estudios las mezclas poliherbales con nutrientes como fosfatidilcolina (Cañada *et al.*, 2018) junto con la metionina herbal han mejorado la producción de leche (Mendoza *et al.*, 2019) y la salud en el ganado lechero (Gutiérrez *et al.*, 2019). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la inclusión de mezclas poliherbales que aportan conjugados de colina (BioCholine, BC), lisina (OptiLysine, L) y metionina (OptiMethionine, M) sobre las variables de producción en vacas lecheras.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cien vacas Holstein del Rancho Don Bosco ubicado en el municipio de San Miguel de Allende Estado de Guanajuato fueron seleccionadas y asignadas a uno de los cinco tratamientos experimentales a los 30 días post parto y hasta los 120 días en leche. Los tratamientos consistieron en la combinación de productos que permitieran evaluar dosis de fuentes naturales de fosfatidilcolina (BioCholine: 0, 20 y 40 g / d) y una mezcla de metionina herbal (OptiMethionine) con lisina (OptiLysine; 40 g Lys + 20 g Met; 80 g Lys + 40 g Met) con o sin BioCholine (Cuadro 1). Se optó por el rancho Don Bosco porque cuenta con un sistema de identificación AfiMilk® que permite la asignación individual de la vaca al tratamiento dietético así como la medición de la producción y composición de la leche, entre otros (Livshin *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Combinación de tratamientos de aditivos herbales

gramos/vaca/día			
Grupo	BioCholine	OptiLysine	OptiMethionine
I	0	0	0
II	20	0	0
III	40	0	0
IV	20	40	20
VI	40	80	40

Las dietas utilizadas en la unidad se presentan en el cuadro 2 y se formularon con base en los requerimientos de la NRC (2001) para ganado lechero.

Cuadro 2. Composición de la ración basal de las vacas lactantes (materia seca) kg/d

	kg/d
Núcleo (proteínica y premezcla mineral y vitaminas)	3.41
Heno de alfalfa	2.64
Ensilaje de alfalfa	4.08
Maíz grano	4.72
Cebada grano	0.90
Melaza de caña	0.68
Ensilaje de maíz	2.40

La materia seca y el nitrógeno total en las dietas se analizaron según la AOAC (1999). Se llevaron a cabo análisis de fibra de detergente neutro (FDN) y fibra de detergente ácido (FDA) de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991). Los contenidos de nutrientes se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición química y nutrientes en la ración basal

Materia seca, %	57.16
ENI Mcal/kg	1.48
Proteína cruda, %	19.68
Rumen DIP, %	52.38
Rumen UIP, %	47.21
Extracto etéreo, %	2.72
Cenizas, %	10.50
FDN, %	28.92
FDA, %	14.33

Se prepararon mezclas de productos herbales en pellets que se dosificaron en el alimentador automático ubicado en la sala de ordeño para asegurar su consumo

(Cuadro 4). Las vacas fueron alimentadas con la ración diseñada por los requerimientos para las vacas. Las vacas fueron seleccionadas y todas estaban dentro de los primeros 30 días postparto. Los tratamientos se dosificaron desde el día 30 después del parto hasta los 120 días en leche. La BioCholine, OptiLysine y OptiMethionine fueron provistas por Nuproxa México (Indian Herbs y Nuproxa Suiza). A los 30 días del experimento, se detectó que las vacas no estaban consumiendo la cantidad total de pellet asignado, por lo que se decidió reformular el pellet e incluir un aromatizante (Sucram) y con un mayor contenido de melaza para estimular el consumo del mismo. El pellet reformulado se presenta en el Cuadro 5. En este momento se consideró importante analizar los compuestos volátiles de los productos herbales porque detectamos un olor fuerte. Eso se realizó en los laboratorios del CIACYT de la UASLP.

Cuadro 4. Composición de los pellets usados de los 30 a 120 días en leche.

Ingrediente	I	II	III	IV
Cascarilla de soya	20.00	15.00	10.00	5.00
Salvado de trigo	20.00	15.00	10.00	5.00
Trigo grano	48.67	52.00	52.00	52.00
Melaza de caña	5.00	5.00	5.00	5.00
Bentonita de Sodio	3.00	3.00	3.00	3.00
BioCholine	3.34	10.00	0.00	10.00
OptiMethionine	0.00	0.00	6.66	6.66
OptiLysine	0.00	0.00	13.34	13.34
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

La producción y composición de la leche se registró diariamente en los equipos automáticos MDS-Milk® que determinan grasa, proteína, lactosa y conductividad de la leche lo que permite el diagnóstico subclínico diario de cetosis y mastitis (Antanaitis *et al.*, 2015; Rutten *et al.*, 2013; Mottram, 1997). Se registraron los tratamientos veterinarios y el número de visitas al hospital. La información sobre el desempeño reproductivo se obtuvo de las bases de datos hasta los 150 días (Williams *et al.*, 2005).

Cuadro 5. Composición de los pellets reformulados (gramos) y usados en el experimento en vacas asignadas de 30 a 120 días postparto.

Ingrediente	I	II	III	IV
Cascarilla de soya	60	120	60	120
Salvado de trigo	60	120	60	120
Trigo grano	136	272	76	152
Melaza de caña	15	30	15	30
Bentonita de Sodio	9	18	9	18
BioCholine	20	40	20	40
OptiMethionine	0	0	20	40
OptiLysine	0	0	40	80
Sucram	2	4	2	4
Total	300	600	300	600

Para explicar el rechazo de los pellets por parte de algunas vacas, se utilizaron muestras de productos herbales para identificar compuestos orgánicos volátiles (COV) por cromatografía de gases flash (FGC), usando una nariz electrónica FGC-E-Nose modelo

Heracles II, equipada con un unidad de inyección automática HS100 (AlphaMOS®, Tolouse, Francia) que está equipada con dos columnas que funcionan en modo paralelo: una columna no polar (DB-5: 5% fenil- 95% dimetilpolisiloxano) y DB-1701 (14% cianopropilfenil- 86% dimetilpolisiloxano) con un inyector mantenido a una temperatura constante de 200°C.



Figura 1. Pellet y comederos individuales automáticos.

Las muestras de los productos herbales se colocaron en viales de 20 mL herméticamente sellados con un tapón y sin ningún tratamiento o solvente de extracción. Los viales se colocaron en el muestreador automático Heracles II, que se colocó en un horno con agitador a 500 rpm durante 900 segundos a 40°C. A continuación, se tomó 1 ml de muestra del espacio de cabeza en la nariz electrónica. Las muestras se analizaron por triplicado. Se creó un solo cromatograma uniendo dos columnas de cromatogramas superpuestos, lo que ayuda a reducir los errores de identificación. Las identificaciones se realizaron utilizando el índice de Kovats con un

estándar C6-C16. El FGC sometió las muestras a un programa de temperatura para separar los compuestos orgánicos volátiles de las muestras, manteniendo un flujo constante de hidrógeno de 1 mL/min. Las muestras se llevaron a una temperatura de 50°C durante 30 s; luego, la temperatura se incrementó en 10°C/s hasta alcanzar 280°C. El software de nariz electrónica detectó especies separadas utilizando un análisis estadístico multivariable (Alpha Soft® by Alpha MOS®).

Análisis estadístico

Para estimar los efectos de los tratamientos a base de hierbas, se eliminó de la base de datos la información de las vacas que no consumieron los pellets experimentales. El porcentaje de rechazo entre tratamientos se analizó con estadística no paramétrica con prueba de Kruskal Wallis y prueba de Nemenyi (Sall *et al.*, 2012). Luego se descartaron para el análisis las vacas que presentaban problemas de salud con infecciones crónicas independientemente de si habían consumido el pellet y/o si tenían más de 40 días con tratamiento antibiótico. Se excluyeron los datos de vacas enfermas porque las enfermedades no estaban asociadas al experimento y el registro veterinario histórico confirmó problemas previos al inicio del experimento.

Este problema redujo el número de vacas deseadas para los análisis, pero consideramos que esta medida es necesaria para poder evaluar sin sesgos los efectos biológicos de los tratamientos (Cuadro 6). La normalidad se probó con la prueba de Shapiro-Wilk, las variables continuas se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (SAS, 1999) y se estimaron los efectos lineales y cuadráticos de las dosis de BioCholine mediante contrastes ortogonales. El peso corporal inicial se utilizó como covariable (Steel *et al.*,

1997). Para estimar el estado de salud de las vacas se analizó el número de tratamientos con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Sall *et al.*, 2012).

Cuadro 6. Descripción del número de vacas que iniciaron experimento y los cambios realizados

	g/d del polihierbal				
BioCholine	0	20	40	20	40
OptiLysine	0	0	0	40	80
OptiMethionine	0	0	0	20	40
Vacas iniciales	20	20	20	20	20
No. vacas que rechazaron pellet	0	3	1	8	9
No. vacas eliminadas por enfermedad	3	4	3	0	1
Total de vacas eliminadas	3	7	4	8	10
No. repeticiones para análisis	17	13	16	12	10

RESULTADOS

La producción de leche no se vio afectada ($P > 0.05$) por la suplementación a base de hierbas, aunque numéricamente las vacas que recibieron 20 g de BioCholine produjeron 0.660 kg más al día que las vacas del control, mientras que con 40 g la producción fue exactamente la misma que en el grupo control, pero cuándo fue

combinado con aminoácidos de hierbas (20, 40, 20) (40, 80, 40) la producción de leche se redujo en más de 1 kg / d (Cuadro 7). La leche corregida en grasa o en energía no muestran diferencias entre tratamientos.

No se detectaron diferencias estadísticas en la composición de la leche (Cuadro 7). Aunque numéricamente con 40 g de BioCholine, la grasa se redujo y cuando se incluyeron aminoácidos herbales en dosis más bajas (20, 40, 20), la grasa y la proteína mostraron un incremento relativo del 1%. Un contraste específico indicó que la grasa de la leche con (20, 40, 20) fue mayor ($P < 0.05$) que con (40, 0, 0).

No se diagnosticó cetosis ni mastitis subclínica por la conductancia de la leche o la proporción de proteínas y grasas. Los cambios en el peso corporal diario y la ganancia diaria mostraron que el equilibrio energético no se vio afectado por los productos herbales consumidos (Cuadro 7).



Figura 2. Revisión del consumo individual de pellet.

Cuadro 7. Efecto de suplementación con herbales en la producción de leche y comportamiento productivo.

	Niveles de inclusión, g/d					EEM
	0	20	40	20	40	
BioCholine	0	20	40	20	40	
OptiLysine	0	0	0	40	80	
OptiMethionine	0	0	0	20	40	
No. vacas	17	13	16	12	10	
Leche inicial kg/d	44.08	45.13	45.68	42.30	42.53	0.763
Leche kg/d	40.60	41.26	40.51	38.96	39.70	0.527
LCG kg/d	35.36	35.71	34.86	34.58	34.86	0.467
LCE kg/d	38.25	38.79	37.95	37.34	37.68	0.492
Grasa %	3.14	3.11	3.07	3.25	3.18	0.014
Proteína %	3.03	3.06	3.08	3.07	3.05	0.030
Lactosa %	4.75	4.73	4.74	4.74	4.74	0.008
Grasa/Proteína	1.04	1.01	1.00	1.06	1.05	0.011
Conductividad	9.66	9.59	9.59	9.68	9.53	0.050
Peso inicial kg	514.44	519.44	515.95	526.45	534.68	7.050
Peso final kg	549.46	552.63	545.93	557.05	551.38	6.302
GDP (90 días)	0.389	0.285	0.334	0.352	0.203	0.041

EEM: Error estándar de la media; LCG: Leche corregida por grasa; LCE: Leche corregida por energía; GDP: Ganancia diaria de peso.

En el cuadro 8 se presentan los valores ajustados por el PC inicial como covariable solo en aquellas variables en las que la covariable fue significativa. La producción de leche muestra la misma tendencia que los datos no ajustados; la ventaja prevista de BioCholine con 20 g/d fue alrededor de 0.8 kg/d. Otras variables se probaron como covariables, pero no tuvieron ningún efecto (ejemplo, producción inicial de leche).

El cuadro 9 muestra los indicadores de salud de los registros veterinarios. Aunque la prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas, el número de días que las vacas recibieron antibióticos fue 2.4 veces menor que en el grupo control. A pesar de que esta variable no tiene una distribución completamente normal (Shapiro-Wilk 0.57), hubo una reducción lineal en el número de días a medida que aumentaron las dosis de BioCholine ($P = 0.06$).

El número de dosis con propilenglicol fue similar y bajo porque los problemas de cetosis son raros después de 30 días después del parto. Se observaron resultados similares en el número de aplicaciones de vitaminas (Cuadro 9).

Para el número de tratamientos reproductivos que corresponden principalmente a aplicaciones de prostaglandinas y otros asociados a la sincronización del celo, la prueba de Kruskal-Wallis mostró solo diferencias de tendencia ($P = 0.19$). Esta variable mostró distribución normal (Shapiro-Wilk 0.87) y el análisis de regresión confirmó que el número de tratamientos se redujo linealmente ($P = 0.09$) al aumentar la dosis de BioCholine (Cuadro 9).

Cuadro 8. Efecto de la suplementación herbal en la producción de leche y comportamiento de vacas (datos ajustados por peso inicial como covariable).

	Niveles de inclusión, g/d					<i>P</i> -value
	0	20	40	20	40	
BioCholine	0	20	40	20	40	
OptiLysine	0	0	0	40	80	
OptiMethionine	0	0	0	20	40	
No. vacas	17	13	16	12	10	
Producción inicial kg/d	43.99	45.18	45.84	42.11	42.06	0.01
Leche kg/d	40.41	41.21	40.59	38.87	39.48	0.09
LCG kg/d	35.26	35.74	34.96	34.48	34.60	0.02
LCE kg/d	38.14	38.81	38.01	37.23	37.40	0.02
Peso final kg	555.63	548.78	550.93	553.92	541.88	0.01

LCG: Leche corregida por grasa; LCE: Leche corregida por energía.

A pesar de que el número de dosis de inmunoestimulantes no tuvo una distribución normal (Shapiro-Wilk 0.51), el análisis de regresión mostró una tendencia a reducir las dosis linealmente ($P = 0.13$) a medida que se incrementaba la dosis de BioCholine (Cuadro 9). La tasa de gestación y el número de servicios (parámetros reproductivos) fueron similares entre los tratamientos (Cuadro 9).

Análisis de compuestos volátiles

La nariz electrónica se utilizó para la detección cualitativa rápida y la discriminación de la colina y la metionina a base de hierbas, mientras que el espectrómetro de masas por cromatografía de gases con analizador de espacio de cabeza (GCMS-HS) se utilizó para el perfil de aroma. Los perfiles cromatográficos obtenidos por nariz electrónica se muestran en las Figuras 3, 4 y 5 para BioCholine, OptiMethionine y OptiLysine respectivamente. La identificación de los picos se llevó a cabo tentativamente con base en los datos de índices de Kovat, la selección se realizó según los compuestos de mayor relevancia (Cuadros 10, 11 y 12).

En la mezcla de BioCholine se identificaron más de 100 compuestos volátiles, pero acetaldehído, 2-propanol, 1-propanol, octano, ciclohexano, (Z) -2-octenal, citronelal, 4-vinilguayacol, trans-2-undecenal, butano, 2, 3 -Pentadeniona, acetato de isopropilo, éter butílico, anetol, sabineno y (Z) whisky lactona estuvieron representados por abundancias más altas (Figura 3 y Cuadro 10).

Cuadro 9. Efecto de la suplementación herbal en el número de tratamientos veterinarios y reproductivos de vacas Holstein

	Niveles de inclusión, g/d					Kruskal-		
	0	20	40	20	40	C.V. %	<i>Xi-Square</i>	<i>P-value</i>
BioCholine	0	20	40	20	40		Wallis	
OptiLysine	0	0	0	40	80		test	
OptiMethionine	0	0	0	20	40			
No. vacas	17	13	16	12	10			
Días con antibióticos	6.2	2.2	1.7	3.9	2.5	198.9	3.8184	0.43
No. dosis con propilenglicol	0.05	0.0	0.06	0.0	0.0	578.7	2.1572	0.70
No. de tratamientos reproductivos	1.2	2.0	2.3	1.4	2.8	95.3	6.0038	0.19
No. dosis de vitaminas	0.2	0.4	0.06	0.8	0.6	259.6	5.4952	0.24
No. dosis de inmunoestimulantes	0.8	0.6	0.10	0.9	0.5	226.0	3.4596	0.48
Gestación %	76.47	69.23	68.75	83.33	60.00	62.7	1.7566	0.81
No. servicios IA	2.4	2.7	2.6	2.8	3.2	69.5	1.5501	0.81

C.V.: Coeficiente de variación; IA: inseminación artificial.

Cuadro 10. Identificación de los principales compuestos volátiles de BioCholine herbal a partir del perfil de nariz electrónico basado en los de índices de Kovat

Tiempo de retención, m	Compuesto	Área relativa	Altura relativa
Columna polar			
15.23	Etanol	0.08	0.11
18.93	Éter Dietil	4.44	4.61
32.45	Octano	8.06	8.41
43.19	[Z]-2-octenal	5.48	6.18
44.53	P-Cresol	2.55	3.27
47.51	4-ethylphenol	33.07	34.64
53.59	4-vinylguaiacol	5.81	7.27
56.14	Trans-2-undecenal	3.97	3.20
Columna No Polar			
13.17	Butano	9.75	10.87
15.26	Trimetilamine	2.49	2.02
17.27	Éter dietil	1.50	1.58
21.62	1-propanol	2.69	2.40
24.25	Isopropil acetato	3.82	3.60
27.67	Octano	6.12	8.49
34.90	Beta pinene	4.56	6.91
48.53	Methylnonanedione	5.38	8.10
51.45	4-vinylguaiacol	3.87	3.21
55.38	P-menthadienhydroperoxide	36.91	27.90

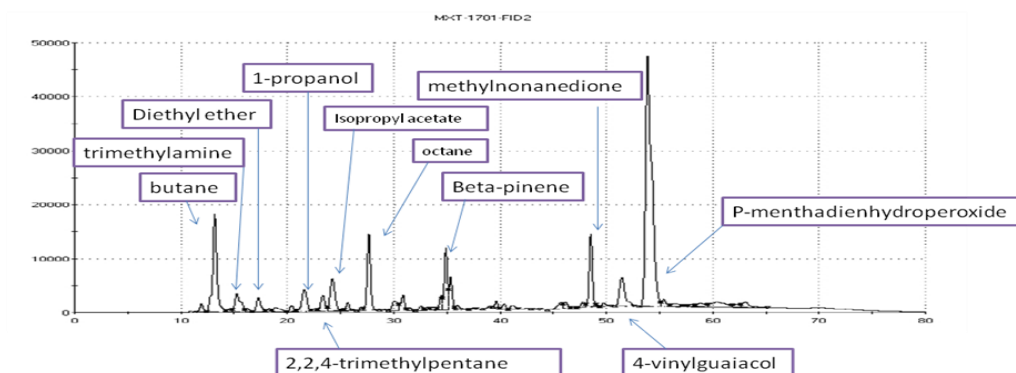


Figura 3. Cromatograma representativo por detector de compuestos volátiles presentes en BioCholine. Se muestran los picos más abundantes y representativos.

La mezcla OptiMethionine contiene más de 100 compuestos volátiles, pero las mayores abundancias son etanol, butanol, octano, ácido 2-metilbutanoico, alfa-felandreno, undecano, [Z] -3-hexenil isobutirato, l undecanoato de metilo, butano, trimetilamina, éter dietílico, 2,2,4-trimetilpentano, octano, [E] -2-penten-1-ol, ácido 2-metilbutanoico, alfa-ionona y delta-decalactona (Cuadro 11).

La mezcla OptiLysine también contiene una gran cantidad de compuestos volátiles, y los más abundantes son etanol, diclorometano, butan-2-ona, pentan-2-ol, [Z] -3-hexenal, 2 ácido metilbutanoico, ácido heptanoico, undecanoato de metol, 2 -metilbutanoato, hexano, butan-2-ona, 2-undecenal y alfa-ionona (Cuadro 12).

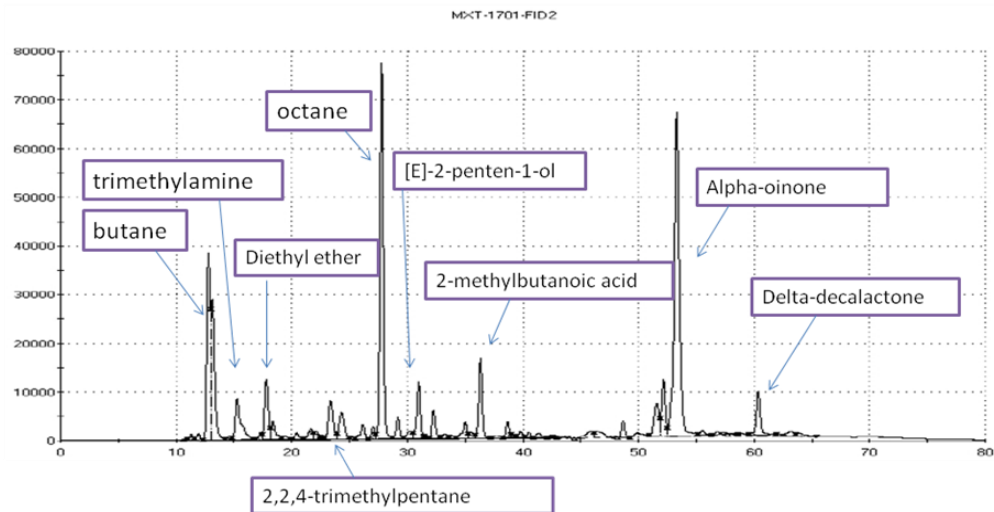


Figura 4. Cromatogramas representativos por detector de compuestos volátiles presentes en OptiMethionine. Se muestran los picos más abundantes y representativos.

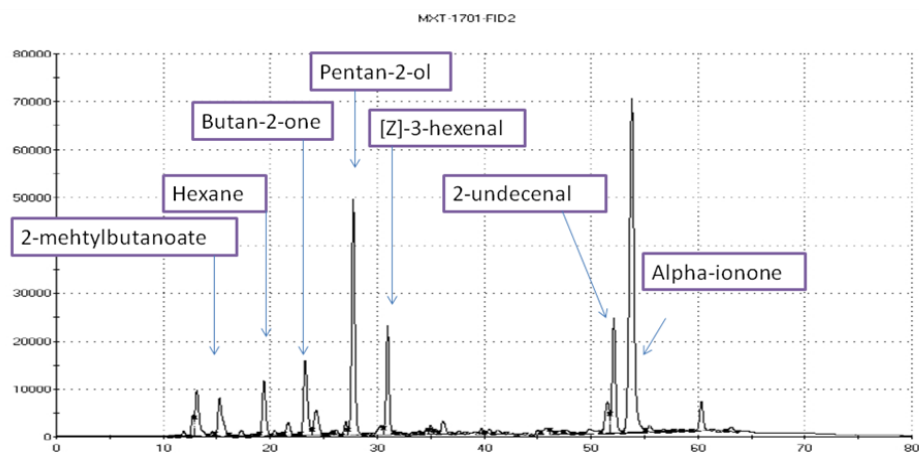


Figura 5. Cromatogramas representativos por detector de compuestos volátiles presentes en OptiLysine. Se muestran los picos más abundantes y representativos.

Cuadro 11. Identificación de los principales compuestos volátiles de OptiMethionine herbal a partir del perfil de nariz electrónico con base en los índices de Kovat.

Tiempo de retención, m	Compuesto	Área Relativa	Altura relativa
Columna Polar			
16.64	Etanol	16.12	17.34
22.64	Butanol	4.12	4.41
32.49	Octano	18.57	23.17
36.81	ácido 2-metilbutanoico	1.24	1.49
41.38	Alpha - Phellandrene	3.9	5.29
45.24	Undecane	12.92	9.37
47.15	[Z]-3-hexenil isobutirato	11.33	7.98
58.14	Metil undecanoate	2.87	3.36
Columna No Polar			
12.79	Butano	8.77	10.62
15.28	Trimetilamina	3.31	2.35
17.8	Éter dietil	3.3	3.45
23.35	2,2,4-trimethylpentane	2.59	2.20
27.77	Octano	17.15	21.43
32.26	[E]-2-penten-1-ol	1.43	1.65
36.34	ácido 2-metilbutanoico	3.78	4.57
53.31	Alpha-ionone	23.22	18.43
60.36	Delta-decalactona	2.60	2.48

Cuadro 12. Identificación de los principales compuestos volátiles de OptiLysine herbal a partir del perfil de nariz electrónico con base en los índices de Kovat.

Tiempo de retención, m	Compuesto	Área Relativa	Altura Relativa
Columna Polar			
16.60	Etanol	4.26	4.45
18.87	Diclorometano	4.40	4.49
22.50	Butan-2-one	4.26	4.72
26.73	Pentan-2-ol	5.82	4.43
32.47	[Z]-3-hexenal	16.10	18.71
35.16	Acido 2-methylbutanoic	7.00	8.36
47.44	Ácido Heptanoico	29.91	27.87
58.09	Metilol undecanoate	7.46	8.88
Columna No Polar			
15.26	2-mehtilbutanoato	3.54	2.94
19.42	Hexano	3.84	4.27
23.27	Butan-2-one	5.78	5.76
27.76	Pentan-2-ol	14.61	18.07
30.98	[Z]-3-hexenal	6.45	8.35
42.13	2-undecenal	7.72	8.87
53.82	Alpha-ionone	31.15	25.65

DISCUSIÓN

El rechazo de pellet fue inesperado dado que en experiencia previa con BioCholine con ovinos que mostraron alta palatabilidad al producto (Rodríguez-Guerrero *et al.*, 2018) y en otros experimentos no se reportaron problemas (Godínez-Cruz *et al.*, 2015; Lee *et*

al., 2016; Crosby *et al.*, 2016; 2017), sin embargo, hubo ciertos indicios en el experimento realizado en la Granja Experimental Universitaria donde las vacas fueron dosificadas oralmente de forma individual (Oviedo *et al.*, 2106), pero cuando se ofreció BioCholine sobre el forraje hasta 20 g/vaca por día no hubo rechazo (Cañada *et al.*, 2017).

Los informes de rechazo de alimento en el ganado son escasos. Se ha informado que la inclusión de urea reduce el consumo de suplementos (Ramos *et al.*, 1998, Cabrera *et al.*, 2000; Kertz, 2010). Es probable que, por la evolución del tipo de forrajes, las ovejas están más dispuestas a consumir plantas con mayor diversidad de compuestos fitoquímicos que los bovinos y esto tiene implicaciones prácticas para no concentrar productos herbales en suplementos o en premezclas bovinas.

El rechazo del pellet por parte de las vacas se explica por el olor a compuestos de hierbas. Primero describimos el principal compuesto volátil para explicar e interpretar los efectos de los productos herbales en la ingesta. El análisis de los compuestos volátiles permitió confirmar un elevado número de estos compuestos, pero al mismo tiempo permitir su uso para identificar compuestos con propiedades nutracéuticas que explican la mejora en los tratamientos de la variable salud.

En el polihierbal OptiMethionine, se detectó una alta presencia de α -Phellandrene, que es un compuesto natural de plantas naturales que se ha utilizado en la industria alimentaria y de perfumes; sin embargo, Lin *et al.* (2013) evaluaron los efectos del α -felandreno en las respuestas inmunitarias en células murinas normales in vivo y encontraron que el α -felandreno promovía las respuestas inmunitarias en el modelo

murino, estimulando la proliferación de macrófagos y promoviendo su función, mejorando la fagocitosis y la actividad de las células NK mediante el aumento los niveles de células T, monocitos y macrófagos en ratones BALB/c in vivo.

En OptiMethionine también estuvo presente Undecane que se ha encontrado como parte de la estructura de limonoides con baja actividad citotóxica con actividad antiinflamatoria como se reporta en los constituyentes químicos de las cortezas de raíz de *Walsura robusta* (Fa-Liang *et al.*, 2017).

El 2 Pentanol que se detectó en OptiLysine es un alcohol presente en muchos productos alimenticios y se informó como compuesto aromático de plátanos frescos (Jordan *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2003). El etanol se puede encontrar en el rumen, particularmente después de la alimentación y cuando la cebada se incluye como grano en la dieta, pero no hay informes de inclusión de etanol en enfermedades metabólicas en vacas (Ametaj *et al.*, 2010) y las cantidades encontradas en los productos a base de hierbas. no son una preocupación.

En algunas frutas también se encuentran compuestos como el acetato de isopropilo y se utiliza como ingrediente aromatizante (FAO, 2015). Podría metabolizarse en el rumen a través del ácido acético y el isopropanol.

Algunos de los productos a base de hierbas mostraron la presencia residual de algunos compuestos volátiles utilizados como disolventes. El éter dietílico que se detectó en BioCholine es un solvente que tiene propiedades anestésicas (Patel *et al.*, 1999) e inhibe la enzima alcohol deshidrogenasa (Normann *et al.*, 1987), pero las concentraciones son muy bajas para ser una preocupación.

Otros compuestos aromáticos son de origen natural y están relacionados con las plantas o interacciones microbianas que pueden haber ocurrido durante el cultivo y están presentes en pequeñas concentraciones. Todos los compuestos son seguros y algunos son utilizados por la industria como agentes aromatizantes y algunos tienen efectos nutracéuticos. El decanoato de metilo detectado en OptiMethionine se usa como aromatizante (Agentes de mejoramiento de alimentos de la UE) pero tiene funciones insecticidas, acaricidas, herbicidas y reguladoras del crecimiento de las plantas (Base de datos de plaguicidas de la UE) y es un componente de muchas plantas (Base de datos de metabolomas humanos HMDB).

El Trans-2-Undecenal que se encuentra en BioCholine se ha encontrado en *Citrullus vulgaris* (Kemp, 1975), en *Curcuma amada* o mango jengibre (Rao *et al.*, 1989; Munafo *et al.*, 2104) es también un aldehído reconocido como aroma de mango. utilizado como aromatizante aprobado en la UE (Agentes de mejoramiento de alimentos de la UE) con propiedades antibacterianas contra *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872, *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Streptococcus mutans* ATCC 125175 y *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 Resultados. Como aldehído, también puede contribuir a la protección ruminal de BioCholine. También es uno de los compuestos del jengibre mango reconocido con algunos efectos contra el cáncer de mama (Li *et al.*, 2017).

El Z 2 Octenal detectado en BioCholine es un compuesto volátil presente en muchas plantas, frutas, flores (Tietel y Masaphy, 2017; Chen *et al.*, 2016; Selli *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2002) y también como una feromona o secreción defensiva de insectos exocritos (Moreira y Millar, 2005; Da Fonseca *et al.*, 2016; Aldrich *et al.*, 2013). El

Octenal se ha evaluado en ratas y se ha demostrado que es el compuesto volátil que causa las respuestas más grandes en el epitelio olfativo de los roedores (Araneda *et al.*, 2004). Por ejemplo, la α -ionona que se encuentra en OptiLysine está presente en varias plantas y se usa en perfumería (Api *et al.*, 2016).

Algunos compuestos no son agradables y están relacionados con el rechazo, como la Trimetilamina, que es un producto de la descomposición de las plantas y se detectó en cantidades traza en BioCholine. Los altos niveles de Trimetilamina están asociados con el desarrollo del síndrome del olor a pescado (Sintermann *et al.*, 2014) y es un indicador de la degradación microbiana de la colina.

En BioCholine se encontró una alta presencia de 4-etilfenol que es un compuesto fenólico utilizado como indicador del estrés de las plantas, presente en varias plantas (Fang y Ramasamy, 2016; Galvao *et al.* 2016) también reportado como un indicador de contaminación ambiental por fenoles. (Li *et al.*, 2016) o por la descomposición de la lignina (Jiang *et al.*, 2016). Otros estudios indican que este olor puede jugar un papel en la supervivencia y reproducción de algunos insectos (Choo *et al.*, 2015) o ser parte de algunas secreciones defensivas (Holliday *et al.*, 2015).

El p-Mentano presente en altas concentraciones en BioCholine mereció atención debido a las diferentes actividades beneficiosas reportadas. Está presente en los exudados de frutos de eucalipto (Eggersdorfer, 2005; Degani *et al.*, 2016) y reportado en la planta aromática *Chenopodium ambrosioides* (Hou *et al.*, 2017) con propiedades repelentes contra mosquitos (Ali *et al.*, 2017; Webb y Hess, 2016) asociado al aceite de limón eucalipto (Diaz, 2016). La 8-p-mentano diamina tiene actividades antibacterianas

contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Zhu *et al.*, 2017). Otros estudios indican que los monoterpenos de tipo p-mentano tienen propiedades para desarrollar fármacos antitripanosomales (De Sousa *et al.*, 2016). Los estudios informados por Andrade *et al.* (2016; 2015) mostraron la alta actividad de citotoxicidad de los derivados de p-mentano contra los tumores de sarcoma humano. Hue *et al.* (2015) reportaron la alta actividad acaricida de los aceites esenciales de la especie *Ocimum* contra la garrapata del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* destacando que los principales constituyentes del aceite son dos derivados de p-mentano: timol y γ -terpineno. Además, se utilizaron derivados monoterpenos de tipo p-Mentano para desarrollar compuestos de base biológica con altas actividades herbicidas (Xu *et al.*, 2017).

El 4-vinilguayacol (2-metoxi-4-vinilfenol) en BioCholine se ha informado en trigo sarraceno (Janes *et al.*, 2008) y café (Dorfner *et al.*, 2003) y en residuos de Camelina (*Camelina sativa*) después de la extracción de aceite (Terpinc y Abramovič, 2016) y se puede obtener en la degradación de las estructuras de lignina de pulpas de eucalipto (Lima *et al.*, 2015) y es un metabolito de interés por su potencial para la producción de vainilla (Furuya *et al.*, 2017) y esta a su vez se utiliza como aromatizante para la alimentación de rumiantes. El 4-vinilguayacol ha demostrado tener propiedades antioxidantes en hepatocitos cultivados al mejorar la transactivación del factor de transcripción regulado por redox Nrf2, conocido por su participación central en la respuesta al estrés celular y los mecanismos de defensa antioxidantes. La enzima antioxidante paraoxonasa 1 fue inducida por 4-vinilguayacol y también disminuyó la expresión del gen de interleucina-6 en macrófagos murinos estimulados por

lipopolisacáridos en células cultivadas (Esatbeyoglu *et al.*, 2015). Pueden presentarse otros efectos; se ha informado como feromonas de insectos (El Sayed, 2017) y es un componente del aceite esencial arvicida de raíces de *Toddalia asiatica* contra el mosquito *Aedes albopictus* (Liu *et al.*, 2013).

La metilnonano diona que se encuentra en BioCholine es uno de los odorantes claves en las vainas de vainilla de Tahití (Takahashi *et al.*, 2013) y se ha identificado en el aceite de soya (Guth y Werner, 2017), y en el té verde japonés (Hattori *et al.*, 2005) que pertenece a la familia de las cetonas y se utiliza como agente aromatizante (Agentes de mejoramiento de alimentos de la UE) aprobado por los comités de regulación de la UE.

El Beta-Pineno presente en BioCholine es un monoterpeno que se encuentra en plantas con el característico olor a pino verde leñoso y es abundante en árboles forestales (Geron *et al.*, 2000; Labokas *et al.*, 2017) pero otras plantas lo contienen como *Cuminum cyminum* (Li y Jiang, 2004; Wang *et al.*, 2009). El β -pineno forma parte de los aceites esenciales de diferentes especies de *Pinus* que tiene actividad antiinflamatoria y citotóxica evaluada con las líneas celulares cancerosas HeLa, CaCo-2 y MCF-7; el β -pineno (de *P. peuce*) es un agente potencial para fármacos anticancerosos y antiinflamatorios (Basholli-Salihi *et al.*, 2017). El aldehído monoterpénico de los β -pinenos (Widhalm *et al.*, 2016) puede ser responsable de la protección ruminal de la BioCholine debido a sus efectos bacteriostáticos y bactericidas (Uribe *et al.*, 1985).

El p-cresol presente en BioCholine es un compuesto fenólico que se encuentra en algunas orquídeas (Williams y Whitten, 1983; Li *et al.*, 2017), informado en *Hydrocotyle javanica* Thunb. (Apiaceae), una hierba medicinal del sur de los Ghats occidentales

(Namasivayam *et al.*, 2017). El compuesto tiene propiedades antisépticas, parasiticidas, desinfectantes y ha sido utilizado como antiséptico intestinal (O'Neil, 2013), sin embargo, el p-cresol se produce por fermentación de proteínas en el intestino grueso (Hamer *et al.*, 2011) y puede considerarse como un producto de fermentación final (Heider *et al.*, 1998) que será absorbido y excretado en heces y orina.

El isobutirato de (Z)-3-hexenilo que se encuentra en OptiMethionine es un metabolito producido por las plantas en respuesta al ataque de herbívoros para atraer depredadores a plantas dañadas por herbívoros (Kessler y Baldwin, 2001) pero debido a su estructura química podría proporcionar algo de energía para el rumiante.

El ácido heptanoico es un compuesto orgánico con un olor desagradable presente en OptiLysine. No puede considerarse un problema para el rumiante porque algunas bacterias ruminales como *Megasphaera hexanoica* sp. producirlo en el rumen (Jeon *et al.*, 2107) y podría ser metabolizado por oxidación beta, produciendo cuerpos cetónicos y ácido propiónico para la síntesis de glucosa (Bingham *et al.*, 2001).

El hexenal Z 3 que se encuentra en OptiLysine es un aldehído que se encuentra en frutos y hojas verdes de varias plantas (Raffo *et al.*, 2018; Mehta *et al.*, 2017; Scala *et al.*, 2107) se usa como agente aromatizante y se ha asociado para la protección de plantas (Nawrocka *et al.*, 2107).

Todas estas propiedades ayudan a explicar la respuesta positiva observada en condiciones prácticas en las que se suplementa con BioCholine además del aporte de nutrientes de colina. Existen pocos estudios de evaluación olfativa en bovinos y algunos ejemplos de algunos ingredientes como el olor a urea se han asociado a una baja ingesta

(Kertz, 2010) pero existen algunas evaluaciones fisiológicas en roedores con algunos compuestos volátiles (Araneda *et al.*, 2004) como los que se encuentran en los productos Indian Herbs. La experiencia del rechazo de algunas vacas indica que en la alimentación práctica debe considerarse un exceso de presencia de los compuestos volátiles al combinar varios productos herbales.

Comportamiento productivo en vacas

Respuesta de BioCholine

La respuesta en la producción de leche con BioCholine fue menor de lo esperado (solo 1.6% con 20 g de BioCholine) por el uso experimental del producto herbal en unidades experimentales (Oviedo *et al.*, 2016; Cañada *et al.*, 2017). Los otros dos experimentos realizados por el grupo de investigación de la UAM-X se realizaron en estaciones experimentales universitarias. En el experimento de Oviedo *et al.* (2106), veinte vacas Holstein (dieta basal de heno de avena, heno de alfalfa, ensilado de maíz y concentrado) con 7 días posparto fueron asignadas a los tratamientos: control (0.0), BioChol + OptiMet (15, 10 g / d por vía oral) por 60 días y los resultados mostraron que la suplementación con productos herbales aumentó ($P < 0.05$) la producción de leche (34.03 vs 32.96 vs kg / d) y el contenido de grasa (2.91 vs 2.82 %). En el segundo experimento (Cañada *et al.*, 2017), ochenta y una vacas multíparas (Holstein, Jersey y sus cruces; puntaje de condición corporal 3.0, peso vivo inicial 506 kg) fueron alimentadas con una dieta basal (17.47 % PC y 2.6 Mcal / kg EM) consistente en el pastoreo de un forraje mixto de alfalfa, pasto, centeno, concentrado suplementario y ensilaje de maíz. Setenta días después del parto, las vacas fueron asignadas

aleatoriamente a los siguientes tratamientos: 0, 10 o 20 g/d de BioCholine durante 90 días con mediciones de la producción y composición de la leche cada 30 días y los resultados de este experimento mostraron que la producción de leche aumentó ($P < 0.05$) a medida que se aumentó la dosis de BioCholine (17.54a; 19.65b; 21.33c; kg / d) para 0, 10 y 20 g / d de BioCholine respectivamente.

Una de las recomendaciones para obtener más beneficios de la colina es complementarla en la ración de transición antes del parto (Grummer, 2013; Hartwell *et al.*, 2000). Inicialmente en este experimento se propuso iniciar los tratamientos antes del parto, pero debido a las características de manejo e instalaciones de la unidad de producción, no fue posible suministrar los pellets durante este período.

La respuesta en la leche fue menor de lo esperado considerando que las vacas en la unidad son de mérito genético y a medida que aumenta la producción de leche y el rendimiento aumenta la demanda de colina para la síntesis de la leche (Elek *et al.*, 2008). Basado en el informe de que la leche entera tiene un total de 14 mg de conjugados de colina total en 100 g de leche (Richard *et al.*, 2016) y que la suplementación con RPC aumenta la concentración de colina en la leche de 99 a 129 mg / kg en producción (Elek *et al.*, 2008), a partir de nuestros datos (Cañada *et al.*, 2107) se hizo una estimación del total de conjugados consumidos por las vacas y el flujo duodenal teórico (Cuadro 14), se calculó que habían suficientes nutrientes para las vacas que habrían producido al menos 3 kg de leche sobre el grupo control. Es posible que otro nutriente tenga una producción limitada, quizás Histidina (Lee *et al.*, 2012) esto en tratamientos con BioCholine.

Cuadro 14. Estimación del flujo duodenal de conjugados totales de colina en los tratamientos con suplementos herbales.

	Niveles de inclusión, g/d				
BioCholine	0	20	40	20	40
OptiLysine	0	0	0	40	80
OptiMethionine	0	0	0	20	40
Consumo MS kg/d	19.02	19.06	18.69	19.77	19.66
Flujo duodenal de colina y conjugados de colina mg/d					
	77.68	436.84	795.30	439.48	789.75

Las dosis de BioCholine para ganado lechero no serán las mismas que las recomendadas para colina protegida ruminalmente (conocida como RPC), pero debemos considerar la dosis utilizada como valores de referencia por consideraciones comerciales. Varios autores recomiendan 15 gramos diarios de RPC y observan un aumento en la producción de 7 a 8 % sobre el control, pero hay reportes de hasta 40 g / d (Scheer *et al.*, 2002; Overton, 2005; Pires y Grummer, 2008). Se estima que los fosfolípidos de BioCholine tienen una mayor actividad biológica y la dosis requerida para el ganado lechero debe estar entre 10 y 15 g / d, pero no se ha determinado el equivalente de actividad biológica de la fosfatidilcolina en relación con el cloruro de colina. El suministro de fosfolípidos evitaría parcialmente la necesidad de síntesis en el

organismo y podría salvar los grupos donantes de metilo, que es una de las principales vías biosintéticas del hígado (Fagone y Jackowski, 2009).

Varios autores han informado de los beneficios de proporcionar colina protegida de la degradación ruminal. Santos y Lima (2009) y Lima *et al.* (2012) informan que en la República Popular China puede mejorar la producción de leche y el estado energético al reducir las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados y ayudar a reducir los problemas de cetosis y la morbilidad general. En esta evaluación no pudimos detectar la mejora en el estado energético, pero pudimos detectar beneficios para la salud a partir de indicadores indirectos como el número de tratamientos veterinarios.

Se ha informado que la suplementación con colina tiene ventajas en términos del estado inmuno-metabólico en las vacas lecheras. Sun *et al.* (2016) informaron que la suplementación con colina aumentó la capacidad antioxidante y la función inmunológica de las vacas lecheras en transición.

En nuestra evaluación, las condiciones de salud del grupo de control indicaron que no hubo problemas metabólicos o de mastitis, por lo tanto, no se manifestaron otros efectos beneficiosos de BioCholine. En los registros veterinarios se reportaron tratamientos veterinarios para cetosis, mastitis, retenciones placentarias y otros problemas pero que estaban presentes en los primeros días alrededor del parto, y podrían haberse reducido con los productos herbales, pero desde de que comenzaron las vacas a recibir la suplementación no observamos el impacto esperado. El hecho de que las vacas que recibieron BioCholine y productos herbales tuvieran menos tratamientos inmunoestimulantes y antibióticos es un indicador de que las propiedades

nutracéuticas de los compuestos volátiles identificados podrían tener un impacto significativo en la longevidad de las vacas de alta producción, lo cual es un problema de gran importancia para este sector.

Se sabe que la colina *per se* ayuda a reducir problemas en el parto como la cetosis y la mastitis, reduciendo la morbilidad general (Lima *et al.*, 2012) y los efectos generales sobre la salud pueden explicarse por otras múltiples funciones de la colina en sus diversos metabolitos en el organismo (Prescott *et al.*, 2000; McIntyre *et al.*, 2009, Lewis *et al.*, 2016), pero es importante enfatizar que BioCholine podría tener una mejor respuesta que la RPC al tener otros fitoquímicos adicionales que se discutieron.

Entre los beneficios reportados para RPC, mejoró la concentración plasmática de interleucina 2 (IL-2) y la proporción de linfocitos T CD4 + / CD8 + en la sangre; niveles reducidos de (TNF- α) e IL-6 (Sun *et al.*, 2016). La suplementación con RPC ha aumentado la capacidad de fagocitosis de los monocitos y ha mejorado la respuesta inmune (Vailati-Riboni *et al.*, 2017). La colina mejora la capacidad antioxidante y la función inmunológica de las vacas lecheras en transición, evaluada en la actividad del glutatión peroxidasa y la vitamina E en sangre (Sun *et al.*, 2016), lo que mejora la salud de los animales y la estabilidad de las membranas en los tejidos.

OptiLysine y OptiMethionine

Los resultados de los aminoácidos a base de hierbas muestran que las dosis seleccionadas tenderían a reducir la producción, especialmente cuando se observan los valores de MCF ajustados. Debemos aprender a utilizar estos productos y comprender que no pueden utilizarse como sustitutos de los aminoácidos protegidos como se

planteó inicialmente. A pesar del bajo contenido de aminoácidos en los productos herbales, las dosis óptimas de estos productos para el ganado lechero deben estar por debajo de los 20 gramos diarios, ya que la respuesta de reducción muestra el efecto que han observado con dosis altas de RPC (Xu *et al.*, 2006).

Para interpretar el efecto de los productos a base de hierbas con lisina y metionina, primero debemos considerar el enfoque cuantitativo tradicional que haría un nutricionista de campo en ganado lechero. Lisina y Metionina se han identificado con mayor frecuencia como los dos aminoácidos más limitantes para las vacas lecheras lactantes en América del Norte (NRC, 2001). Existe un acuerdo general de que para obtener la máxima producción de leche es importante equilibrar las dietas para que Lys y Met mantengan una proporción óptima en la proteína metabolizable (Schwab, 2012). Los nutricionistas de campo informan un retorno de la inversión de 2.5 o más cuando equilibran Lys y Met. Existe un acuerdo general en la proporción 3: 1 (Rulquin, 2001; Lara *et al.*, 2004), pero se han reportado rangos entre 3:1 y 3.8:1 con el requerimiento en gramos de Met de 48 a 62 y Lys 160 y 185 g / d (Ordway y Aines, 2010). Con base en estas consideraciones, todas las raciones cumplen con los requerimientos de aminoácidos (Cuadro 15) y la inclusión de OptiLysine herbal podría incrementar el flujo duodenal de 3 a 6 gramos mientras que la adición de OptiMethionine de 2 a 4 gramos diarios.

Es importante señalar que se ha confirmado la fracción de sobrepaso de ambos productos herbales con la técnica de liberación de amoníaco N (Lorenzana *et al.* 2021). Según los estudios de Lys, la respuesta de la leche debería tener linealmente hasta un 6 % con respecto al control (Rulquin *et al.*, 1993) y en el caso de Met, el incremento

debería ser de alrededor del 2 % (Lara *et al.*, 2006), sin embargo, en algunos estudios como el nuestro se observó respuesta con aminoácidos graduados (Rulquin *et al.*, 1994). Se esperaba una mayor producción con la combinación de metionina y lisina como se informó en otros estudios (Awawedeh, 2106; Třináčtý *et al.*, 2006). La falta de respuesta puede estar relacionada con la optimización a otros aminoácidos que generalmente no se consideran, Rulquin (2001) sugiere que es importante optimizar la histidina y treonina para aumentar la producción de leche. El flujo de histidina merece más atención en estudios futuros (Lee *et al.*, 2012).

Cuadro 15. Estimación del flujo duodenal de aminoácidos con suplementos de hierbas.

	Niveles de inclusión, g/d				
BioCholine	0	20	40	20	40
OptiLysine	0	0	0	40	80
OptiMethionine	0	0	0	20	40
Consumo MS kg/d	19.02	19.06	18.69	19.77	19.66
Lys Duodenal g/d	163.17	163.17	163.17	166.45	169.73
Met Duodenal g/d	51.12	51.12	51.12	53.58	56.04
Lis/Met	3.19	3.19	3.19	3.11	3.03

Lee *et al* (2012) informaron un requerimiento de 58 g / d de histidina. Nuestra estimación de la dieta basal proporcionó 51.74 g / d. Es necesario revisar las estimaciones de las bacterias del rumen y los cálculos de derivación de él. La precisión del flujo de aminoácidos es un desafío para los nutricionistas de ganado lechero para suministrar suficiente lisina y metionina para optimizar la producción de leche y sus componentes.

Conclusiones

La respuesta en la producción de leche no fue la esperada, sin embargo, numéricamente el mejor resultado se observó con 20 g / d de BioCholine lo que representó un aumento de 1.6 % en la producción de leche. También hubo beneficios para la salud con el uso de BioCholine; el número de dosis de antibióticos se redujo 3 veces en comparación con las vacas sin suplementar. El número de dosis de inmunoestimulantes y tratamientos reproductivos tendió a reducirse cuando se aumentó la dosis de BioCholine.

La suplementación de BioCholine combinada con OptiMethionine y OptiLysine tendió a reducir la producción de leche en un 3.1 %, por lo que el uso de aminoácidos de hierbas en la alimentación del ganado lechero debe repensarse con otra estrategia, incluso cuando hubo una reducción en el número de dosis con antibióticos dos veces en comparación con las vacas del grupo control.

REFERENCIAS

- Aldrich, J. R.; Chauhan, K. R.; Zhang, A.; Zarbin, P. H. G. 2013. Exocrine secretions of wheel bugs (Heteroptera: Reduviidae: *Arilus spp.*): Z. Naturforsch., C, J. Biosci. 68 C: 522-526.
- Ali, A.; Cantrell, C. L.; Khan, I. A. 2017. A new in vitro bioassay system for the discovery and quantitative evaluation of mosquito repellents. J. Med. Entomol. 54: 1328-1336.
- Ametaj, N. B.; Qendrim, Z.; Fozia, S. 2010. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. Metabolomics 6: 583–594.
- Andrade, L. N.; Amaral, R. G.; Dória, G. A. A.; Fonseca, C. S.; Da Silva, T. K. M.; Júnior, R. L. C.; Thomazzi, S. M.; Nascimento, L. G. D.; Carvalho, A. A.; De Sousa, D. P. 2016. *In vivo* anti-tumor activity and toxicological evaluations of perillaldehyde 8,9-epoxide, a derivative of perillyl alcohol. Int. J. Mol. Sci. 17: 2-11.
- Andrade, L. N.; Lima, T. C.; Amaral, R. G.; Do Ó Pessoa, C.; De Moraes Filho, M. O.; Soares, B. M.; Do Nascimento, L. G.; Carvalho, A. A. C.; De Sousa, D. P. 2015. Evaluation of the cytotoxicity of structurally correlated p-menthane derivatives. Molecules. 20: 13264-13280.
- Antanaitis, R.; Žilaitis, V.; Kučinskas A.; Juozaitienė, V.; Leonauskaitė, K. 2015. Changes in cow activity, milk yield, and milk conductivity before clinical diagnosis of ketosis, and acidosis. Vet. Med. Zoot. 70: 3-9.

- AOAC. 1999. Association of Official Analytical Chemists. Methods of Analysis. Washington D.C., USA.
- Api, A. M.; Belsito, D.; Bhatia, S.; Bruze, M.; Calow, P.; Dagli, M. L.; Dekant, W.; Fryer, A. D.; Kromidas, L.; La Cava, S.; Lalko, J. F.; Lapczynski, A.; Liebler, D. C.; Miyachi, Y.; Politano, V. T.; Ritacco, G.; Salvito, D.; Schultz, T. W.; Shen, J.; Sipes, I. G.; Wall, B.; Wilcox, D. K. 2016. RIFM fragrance ingredient safety assessment, a-Ionone, CAS Registry Number 127-41-3. Food Chem. Toxicol. 97: S1-S10.
- Araneda, R. C.; Peterlin, Z.; Zhang, X.; Chesler, A.; Firestein, S. 2014. A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. J. Physiol. 555: 743–756.
- Baldi, A.; Pinotti, L. 2006. Choline metabolism in high-producing dairy cows; metabolic and nutritional basis. Can. J. Anim. Sci. 86: 207-212.
- Basholli-Salih, M.; Roswitha, S.; Avni, H.; Dafina, M.; Helmut, V.; Behxhet, M.; Monika, M. 2017. Phytochemical composition, anti-inflammatory activity and cytotoxic effects of essential oils from three *Pinus* spp. Pharm Biol. 55: 1553–1560.
- Bingham, E.; Cochrane, B.; Powell, C. H. 2001. Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y.
- Cabrera, E. J. I.; Mendoza, M. G. D.; Aranda, E.; García-Bojalil, C.; Bárcena, R.; Ramos, J. A. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* GD and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. Anim. Feed Sci. Technol. 83: 49-55.

- Cañada, L. M. G.; Meráz, R. E.; Lemus, R. V.; Mendoza, G. D. 2017. Efecto de Biocolina (fosfatidil colina) sobre la producción y calidad de leche de vaca bajo condiciones de pastoreo. Tesis Ingeniería en Agrotecnología, Universidad Politécnica de Francisco I. Madero. México.
- Cañada, L. M. G.; Meráz-Romero, E.; Mendoza-Martínez, G. D.; Villagrán-Vélez, B.; Castillo-Mata, D.A. 2018. Efecto del nivel de colina herbal en la producción y composición de leche en ganado lechero en pastoreo. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 26: 82.
- Chen, J. M.; Song, J. Y.; He, J.; Gu, X. R.; Zhang, X. 2016. Studies on volatile components in the flowers of *Cymbidium goeringii* and *Cymbidium faberi* from Qinling mountains. Acta Hort. Sinica. 43: 2461-2472.
- Choo, Y. M.; Buss, G. K.; Tan, K.; Leal, W. S. 2105. Multitasking roles of mosquito labrum in oviposition and blood feeding. Front. Physiol. 6: 306.
- Crosby, G. M. M.; Lee, H. A.; Mendoza, G. D. 2016. Comparación de fuentes de colina para ovejas lecheras. VII Congreso Latinoamericano de Nutrición Animal. XII Congreso Bial Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. Resúmenes. Cancún México.
- Crosby, M.; Mendoza-Martínez, G. D.; Relling, A.; Vázquez, V. A.; Lee-Rangel, H. A.; Martínez, J. A.; Oviedo, M. 2017. Influence of supplemental choline on milk yield, fatty acid profile, and postpartum weight changes in suckling ewes. J. Dairy Sci. 100 Suppl. 2:125.

- Da Fonseca, F. S. A.; Medeiros, M.; Salomão, A. T.; Vasconcellos-Neto, J.; Marsaioli AJ. 2106. (E)-4-Oxo-2-hexenal dimers in the scent glands of the bark bug *Phloea subquadrata* (Heteroptera, Phloeidae). J. Braz. Chem. Soc. 27: 1459-1464.
- De Sousa, D. P.; Lima, T. C.; Steverding, D. 2016. Evaluation of antiparasitic activity of *Mentha crispa* essential oil, its major constituent rotundifolone and analogues against *Trypanosoma brucei*. Planta Medica. 82: 1346-1350.
- Degani, A. V.; Dudai, N.; Bechar, A.; Vaknin, Y. 2016. Shade effects on leaf production and essential oil content and composition of the novel herb *Eucalyptus citriodora* Hook. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 19: 410-420.
- Diaz, J. H. 2016. Chemical and plant-based insect repellents: Efficacy, safety, and toxicity. Wilderness Environ Med. 27: 153-163.
- Dorfner, R.; Ferge, T.; Kettrup, A.; Zimmermann, R.; Yeretzyan, C. 2003. Real-time monitoring of 4-vinylguaiacol, guaiacol, and phenol during coffee roasting by resonant laser ionization time-of-flight mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 51: 5768-5773.
- El Sayed. 2017. The Pherobase Database of Pheromones and Semiochemicals. Semiochemical - 2-methoxy-4-vinylphenol, Pherobase.com.
- Elek, P.; Newbold, J. R.; Gaal, T.; Wagner, L.; Husveth, F. 2008. Effects of rumen-protected choline supplementation on milk production and choline supply of periparturient dairy cows. Animal. 2: 1595-1601.

- Eggersdorfer, M. 2005. Terpenes. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. doi:10.1002/14356007.a26_205.
- Esatbeyoglu, T.; Ulbrich, K.; Rehberg, C.; Rohn, S.; Rinbach G. 2015. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. Food Funct. 6: 887-893.
- Fa-Liang, A.; Dong-Mei, S.; Rui-Jun, L.; Miao-Miao, Z.; Ming-Hua, Y.; Yong, Y.; Ling-Yi, K.; Jun, L. 2017. Walrobsins A and B, two anti-inflammatory limonoids from root barks of *Walsura robusta*. Org. Lett. 19: 4568-4571.
- FAO/WHO Food Additive Evaluations - JECFA ISOPROPYL ACETATE". 2015. International Chemical Safety Cards. Record Name: ISOPROPYL ACETATE. URL: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=2015>
- Fang, Y.; Ramasamy, R. P. 2016. Detection of p-ethylphenol, a major plant volatile organic compound, by tyrosinase-based electrochemical biosensor. ECS J. Solid State Sci. Technol. 5: M3054-M3059.
- Frankič, T.; Voljč, M.; Salobir, J.; Rezar. Rezar. 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. Acta Agric. Slov. 94: 95-102.
- Furuya, T.; Kuroiwa, M.; Kino, K. 2017. Biotechnological production of vanillin using immobilized enzymes. J. Biotechnol. 243: 25-28.

- Galvao, M. S.; Nunes, M. L.; Constant, P. B. L.; Narain, N. 2016. Identification of volatile compounds in cultivars barker, collinson, fortuna and geadá of avocado (*Persea americana*, Mill.) fruit. Food Sci. Technol. 36: 439-447.
- Geron, C.; Rasmussen, R.; Arnts, R. R.; Guenther, A. 2000. A review and synthesis of monoterpene speciation from forests in the United States. Atmos. Environ, 34: 1761-1781.
- Godínez-Cruz, J.; Cifuentes-López, O.; Cayetano, J.; Lee-Rangel, H. A.; Mendoza, G.; Vázquez, A.; Roque, A. 2015. Effect of choline inclusion on lamb performance and meat characteristics. J. Anim. Sci. 93 (Suppl. 3): 766 (Abstr).
- Grummer, R. R. 2013. Choline: A Limiting Nutrient for Transition Dairy Cows. Proceedings of the Florida Ruminant Nutrition Conference. p. 22-29.
- Guth, H.; Werner, G. 2017. 3-Methylnonane-2,4-dione. Fette Seifen Anstrichm. 91: 225-230.
- Gutiérrez, A. R.; Gutiérrez, A.; Sánchez, C.; Mendoza, G. D. 2019. Effect of including herbal choline in the diet of a dairy herd; a multiyear evaluation. Emir. J. Food Agric. 31(6): 477-481.
- Hamer, H. M.; De Preter, V.; Windey, K.; Verbeke, K. 2011. Functional analysis of colonic bacterial metabolism: relevant to health? AJP: Gastrointest, Liver Physiol. 302: G1-G9.
- Hartwell, J. R.; Cecava, M. J.; Donkin, S. S. 2000. Impact of dietary rumen undegradable protein and rumen-protected choline on intake, peripartum liver

- triacylglyceride, plasma metabolites and milk production in transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 2907-2917.
- Hattori, S.; Takagaki, H.; Fujimori, T. 2005. Identification of volatile compounds which enhance odor notes in Japanese green tea using the OASIS (original aroma simultaneously input to the sniffing port) method. *Food Sci. Technol. Res.* 11: 171-174.
- Heider, J.; Spormann, A. M.; Beller, H. R.; Widdel, F. 1998. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 459-473.
- Holliday, A. E.; Mattingly, T. M.; Holliday, N. J. 2015. Defensive secretions of larvae of a carabid beetle. *Physiol. Entomol.* 40: 131-137.
- Hou, S. Q.; Li, Y. H.; Huang, X. Z.; Li, R.; Lu, H.; Tian, K.; Ruan, R. S.; Li, Y. K. 2017. Polyol monoterpenes isolated from *Chenopodium ambrosioides*. *Nat. Prod. Res.* 31: 2467-2472.
- Hue, T.; Cauquil, L.; Fokou, J. B. H.; Dongmo, P. M. J.; Bakarnga-Via, Menut, C. 2015. Acaricidal activity of five essential oils of *Ocimum* species on *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* larvae. *Parasitol. Res.* 114: 91-99.
- Janes, D.; Kantar, D.; Kreft, S.; Prosen, H. 2008. Identification of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) aroma compounds with GC-MS. *Food Chem.* 112: 120-124.
- Jiang, W.; Lyu, G.; Wu, S.; Lucia, L. A.; Yang, G.; Liu, Y. 2106. Supercritical water-induced lignin decomposition reactions: A structural and quantitative study. *BioResources.* 11: 5660-5675.

- Jeon, B. S.; Kim, S.; Sang, B. I. 2017. *Megasphaera hexanoica* sp. Nov., a medium-chain carboxylic acid-producing bacterium isolated from a cow rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 2114-2120.
- Jordan, M. J.; Tandon, K. S.; Philip, E.; Goodner, K. L. 2001. Aromatic profile of aqueous banana essence and banana fruit by Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS) and Gas Chromatography–Olfactometry (GC-O). *J. Agric. Food Chem.* 49: 4813–4817.
- Kemp, T. R. 1975. Identification of some volatile compounds from *Citrullus vulgaris*. *Phytochemistry.* 14: 2637-2638.
- Kertz, A. F. 2010. Urea feeding to dairy cattle: a historical perspective and review *Prof. Anim. Sci.* 26: 257-272.
- Kessler, A.; Baldwin, I. T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science.* 291: 2141-2143.
- Kolling, G. J.; Stivanin, S. C. B.; Gabbi, A. M.; Machado, F. S.; Ferreira, A. L.; Campos, M. M.; Tomich T. R.; Cunha S. C.; Dill, W. S.; Pereira, R. G. L.; Fischer V. 2018. Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. *J. Dairy Sci.* 101: 4221-4234.
- Labokas, J.; Ložienė, K.; Jurevičiūtė, R. 2017. Preconditions for industrial use of foliage as felling by-product of Scots pine for essential oil production. *Ind. Crops Prod.* 109: 542-547.

- Lee, C.; Hristov, A. N.; Cassidy, T. W.; Heyler, K. S.; Lapierre, H.; Varga, G. A.; de Veth, M. J.; Patton, R. A.; Parys, C. 2012. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *J. Dairy Sci.* 95: 6042-6056.
- Lee, H. A.; Mendoza, G. D.; Hernández, P. A. 2016. Comparación de fuentes de colina en raciones de finalización de corderos. VII Congreso Latinoamericano de Nutrición Animal. XII Congreso Bienal Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. Resúmenes. Cancún México.
- Lejonklev, J.; Kidmose, U.; Jensen, S.; Petersen, A. M.; Helwing, F. L. A.; Mortensen, G.; Weisbjerg, R. M.; Larsen, M. K. 2016. Short communication: effect of oregano and caraway essential oils on the production and flavor of cow milk. *J. Dairy Sci.* 99: 7898-7903.
- Li, B.; Liu, R.; Gao, H.; Tan, R.; Zeng, P.; Song, Y. 2016. Spatial distribution and ecological risk assessment of phthalic acid esters and phenols in surface sediment from urban rivers in Northeast China. *Environ. Pollut.* 219: 409-415.
- Li, R.; Jiang, T. Z. 2004. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. *Flavour Fragr. J.* 19: 311-313.
- Li, Y.; Li, S.; Meng, X.; Zhang, J. J.; Li, H. B. 2017. Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients.* 9: 728.
- Lima, C. F.; Barbosa, L. C. A.; Silva, M. N. N.; Colodette, J. L.; Silvério, F. O. 2015. *In situ* determination of the syringyl/guaiacyl ratio of residual lignin in pre-bleached

- eucalypt kraft pulps by analytical pyrolysis. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 112: 164-172.
- Lin, J. J.; Lin, J. H.; Hsu, S. C.; Weng, S. W.; Huang, Y. P.; Tang, N. Y.; Lin, J. G.; Chung, J. G. 2013. Alpha-phellandrene promotes immune responses in normal mice through enhancing macrophage phagocytosis and natural killer cell activities. *In Vivo*. 27: 809-814.
- Liu, X. C.; Dong, H. W.; Zhou, L.; Du, S. S.; Liu, Z. L. 2013. Essential oil composition and larvicidal activity of *Toddalia asiatica* roots against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* 112, 1197-1203.
- Livshin, N.; Aizinbud, E.; Tinsky, M.; Bargai, U.; Maltz, E. 2003. Automated monitoring of dairy cows behavioral patterns as a tool for management. In: Proceedings, International Congress on Information Technology in Agriculture, Food and Environment, 7 to 10 October 2003, Izmir, Turkey.
- Mehta, P. K.; de Sousa, G. M.; Soares, A. C.; Nogueira, J. P.; Narain, N. 2017. Volatile constituents of jambolan (*Syzygium cumini* L.) fruits at three maturation stages and optimization of HS-SPME GC-MS method using a central composite design. *Food Analytical Methods*. In press.
- Mendoza, G. D.; Oviedo, F. M.; Pinos, M. J.; Lee-Rangel, A. H.; Vázquez, A.; Flores, R.; Pérez, F.; Roque, A.; Cifuentes, O. 2020. Milk production in dairy cows supplemented with herbal choline and methionine. *Rev. Fac. UNCUYO*. 52(1): 332-343.
- Mottram, T. 1997. Automatic monitoring of the health and metabolic status of dairy cows. *Livestock Prod. Sci.* 48: 209-217.

- Moreira, J. A.; Millar, J. G. 2005. Short and simple syntheses of 4-Oxo-(E)-2-Hexenal and homologs: pheromone components and defensive compounds of Hemiptera. *J. Chem. Ecol.* 31: 965–968.
- Munafo, J. P.; Didzbalis, J.; Schnell, R. J.; Schieberle, P.; Steinhaus, M. 2014. Characterization of the major aroma-active compounds in mango (*Mangifera indica* L.) cultivars haden white alfonso, praya sowoy, royal special, and malindi by application of a comparative aroma extract dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 62: 4544–4551.
- Namasivayam, K.; Karuppanan, A.; Habibulla, A. K.; Rangasamy, N. 2017. GC- MS profiling of ethnomedicinal plant *Hydrocotyle javanica* thumb. *Orient. J. Chem.* 33: 2127-2133.
- Nawrocka, J.; Małolepsza, U.; Szymczak, K.; Szczech, M. 2017. Involvement of metabolic components, volatile compounds, PR proteins, and mechanical strengthening in multilayer protection of cucumber plants against *Rhizoctonia solani* activated by *Trichoderma atroviride* TRS25. *Protoplasma*. In press.
- Nogueira, J. M. F.; Fernandes, P. J. P.; Nascimento, A. M. D. 2003. Composition of volatiles of banana cultivars from Madeira Island. *Phytochem. Anal.* 14: 87–90.
- Normann, P. T.; Ripel, A.; Morland, J. 1987. Diethyl ether inhibits ethanol metabolism in vivo by interaction with alcohol dehydrogenase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 11: 163–166.

- O'Neil, M. J. 2013. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 460.
- Oviedo, M. F.; Lee, H. H. A.; Mendoza, G. D.; Vázquez, V. A.; Martínez, G. J. A.; Hernández, G. P. A.; Pinos, R. J. M. 2016. Uso de colina y metionina de origen vegetal en vacas lactantes. VII Congreso Latinoamericano de Nutrición Animal. XII Congreso Bienal Asociación Mexicana de Especialistas en Nutrición Animal. Resúmenes. Cancún México.
- Patel, A. J.; Honoré, E.; Lesage, F.; Fink, M.; Romey, G.; Lazdunsk, M. 1999. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* 2: 422-426.
- Raffo, A.; Masci, M.; Moneta, E.; Nicoli, S.; Sánchez del Pulgar, J.; Paoletti, F. 2018. Characterization of volatiles and identification of odor-active compounds of rocket leaves. *Food Chem.* 240: 1161-1170.
- Ramos, J. A.; Mendoza, G. D.; Aranda, E.; García-Bojalil, C.; Bárcena, R.; Alanís, J. 1998. Escape protein supplementation of growing steers grazing stargrass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70: 249-256.
- Rao, A. S.; Rajanikanth, B.; Seshadri, R. 1989. Volatile aroma components of *Curcuma amada* Roxb. *J. Agric. Food Chem.* 37: 740-743.
- Richard, C.; Lewis, E. D.; Zhao, Y. Y.; Asomaning, J.; Jacobs, R. L.; Field, C. J.; Curtis, J. M. 2016. Measurement of the total choline content in 48 commercial dairy products or dairy alternatives. *J. Food Compos. Anal.* 45: 1-8.

- Rodríguez-Guerrero, V.; Lizarazo, C. A.; Ferraro, S. I.; Suárez, N.; Miranda, A. L.; Mendoza G. D. 2018. Effect of herbal choline and rumen-protected methionine on lamb performance and blood metabolites. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 48: 427-434.
- Rutten, C. J.; Velthuis, J. G. A.; Steeneveld, W.; Hogeveen, H. 2013. Invited review: sensors to support health management on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 96: 1928-1952.
- Sall, J.; Lehman, A.; Stephens, M.; Creighton, L. 2012. *JMP® Start Statistics: A Guide to Statistics and Data Analysis*. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.
- Santos, J. E. P.; Lima, F. S. 2009. Feeding rumen-protected choline to transition dairy cows. Department of Animal Sciences, College of Veterinary Medicine. University of Florida. dairy.ifas.ufl.edu/rns/2009/Santos.pdf.
- Scala, A.; Mirabella, R.; Goedhart, J.; de Vries, M.; Haring, M. A.; Schuurink, R. C. 2017. Forward genetic screens identify a role for the mitochondrial HER2 in E-2-hexenal responsiveness. *Plant Molecular Biology*. In press.
- Selli, S.; Kelebek, H.; Ayseli, M. T.; Tokbas, H. 2014. Characterization of the most aroma-active compounds in cherry tomato by application of the aroma extract dilution analysis. *Food Chem.* 165: 540-546.
- Sintermann, J.; Schallhart, S.; Neftel, A. 2014. Trimethylamine emissions in animal husbandry. *Biogeosciences*. 11: 5073-5085.
- Takahashi, H.; Sumitani, H.; Inada, Y.; Mori, D. 2002. Identification of volatile compounds of kombu (*Laminaria* spp.) and their odor description. *J. Jpn. Soc. Food. Sci.* 49: 228-237.

- Takahashi, M.; Inai, Y.; Miyazawa, N.; Kurobayashi, Y.; Fujita, A. 2013. Identification of the key odorants in tahitian cured vanilla beans (*Vanilla tahitensis*) by GC-MS and an aroma extract dilution analysis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 601-605.
- Terpinc, P.; Abramovič, H. 2016. Camelina (*Camelina sativa* (L.) Crantz) oilcake - Untapped resource of phenolic compounds. *Acta Agric. Slov.* 107: 243-250.
- Tietel, Z.; Masaphy, S. 2017. Aroma-volatile profile of black morel (*Morchella importuna*) grown in Israel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. In press.
- Uribe, S.; Ramirez, J.; Peña, A. 1985. Effects of beta-pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* 3:1195-1200.
- Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and nonstarch carbohydrates in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science.* 74: 3583-3597.
- Wang, L.; Wang, Z.; Zhang, H.; Li, X.; Zhang, H. 2009. Ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace single drop micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry for analysis of the essential oil in *Cuminum cyminum* L. *Anal. Chim. Acta.* 647: 72-77.
- Webb, C. E.; Hess, I. M. R. 2016. A review of recommendations on the safe and effective use of topical mosquito repellents. *Public Health Res. Pract.* 26: e2651657.

- Widhalm, B.; Ters, T.; Srebotnik, E.; Rieder-Gradinger, C. 2016. Reduction of aldehydes and terpenes within pine wood by microbial activity. *Holzforschung*. 70: 895-900.
- Williams, E. J.; Fischer, D. P.; Pfeiffer, D. V.; Englang, G. C.; Noakes, D. E.; Dobson, H.; Sheldon, I. M. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 63: 102–111.
- Williams, N. H.; Whitten, W. M. 1983. Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *Biol. Bull.* 164: 355-395.
- Xu, S. C.; Zhu, S. J.; Wang, J.; Bi, L. W.; Chen, Y. X.; Lu, Y. J.; Gu, Y.; Zhao, Z. D. 2017. Design, synthesis and evaluation of novel cis-p-menthane type Schiff base compounds as effective herbicides. *Chin. Chem. Lett.* 28: 1509-1513.
- Zhu, S.; Yang, X.; Xu, S.; Zhao, Z.; Jiang, J. 2017. Synthesis and antibacterial activity of bis-alkanoyl-amines heterocyclic derivatives of cis-1, 8-p-Menthane Diamine. *Chemistry and Industry of Forest Products*. 37: 79-84.

CAPÍTULO 2. IMPACTO ECONÓMICO DEL USO DE MEZCLAS POLIHERBALES CON FOSFADITILCOLINA, LISINA Y METIONINA EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y SALUD DE VACAS LECHERAS

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto económico de suplementar a las vacas lecheras con mezclas de productos polihierbales que aportan conjugados de colina (BioCholine, BC), lisina (OptiLysine, L) y metionina (OptiMethionine, M), considerando los costos de los tratamientos veterinarios, los efectos nutraceuticos de las mezclas, el costo parcial y los retornos de la producción de leche. Se asignaron al azar ochenta vacas Holstein posparto con la siguiente distribución, las que no consumieron pellet (Control, 20 vacas) y las que contenían productos polihierbales (g/d) (BC20, 19 vacas; BC40, 17 vacas; BC20 + L40 + M20, 12 vacas y BC40 + L80 + M40, 12 vacas), el pellet fue ofrecido durante el ordeño a través de comederos automáticos durante 90 días en un establo comercial. Los costos de los tratamientos empleados se agruparon en antibióticos, cicatrizantes, antiinflamatorios, glucogénicos, hormonales, intramamarios, reconstituyentes y vitaminas. La producción de leche no se vio afectada ($P > 0.05$) por los aditivos polihierbales, pero hubo diferencias numéricas en el número de tratamientos y costos. El costo en salud animal por vaca mostró un alto coeficiente de variación (promedio 347 %). Las vacas que recibieron BC40 y BC20 + L40 + M20 tuvieron un costo en salud animal menor por vaca, pero solo el tratamiento BC40 mostró efectos residuales después del experimento con una mejora económica del 2.1 % sobre el grupo control, mostrando beneficios asociados a una reducción en el número de dosis con antibióticos y de inmunoestimulantes. Las vacas que recibieron BC40

tuvieron la mejor producción de leche numéricamente en combinación con el menor número de costos en salud animal que resultaron en los ingresos más altos.

Palabras clave: Aditivos herbales; Análisis económico; Salud; Vacas lecheras.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the economic impact of supplementing dairy cows with mixtures of polyherbal products supplying conjugates of choline (BioCholine, BC), lysine (OptiLysine, L) and methionine (OptiMethionine, M), considering the costs of veterinary treatments, the nutraceutical effects of the mixtures, the partial cost and returns of milk production. Eighty postpartum Holstein cows were randomly assigned to individually receive. The pellets no containing (Control, 20 cows) and containing polyherbal products (g/d) (BC20, 19 cows; BC40, 17 cows; BC20+L40+M20, 12 cows, and BC40+L80+M40, 12 cows) were offered to cows during the milking through automatic feeders in the course of 90 days in a commercial farm. Treatment costs were grouped in terms of antibiotics, healing, anti-inflammatories, glucogenics, hormonal, intra-mammary, restorative and vitamins. Milk production was not affected ($P>0.05$) by polyherbal additives but there were numerical differences in the number of treatments and costs; animal health cost per cow showed a high variation coefficient (average 347%). Cows receiving BC40 and BC20+L40+M20 had reduced animal health cost per cow but only the treatment BC40 showed residual effects post experiment with an economic improvement of 2.1 % over the control group, showing benefits associated to a reduction in the number of doses with antibiotics and doses of immune-stimulants. Cows receiving BC40 had the best milk yield numerically in

combination with the lower number of animal health costs which resulted in the highest income.

Key words: Dairy cow; Economic analyses; Feed plant additive; Health.

INTRODUCCIÓN

La suplementación convencional de nutrientes protegidos ruminalmente (aminoácidos o colina) ha demostrado que pueden mejorar la producción de leche (Cho *et al.*, 2007; Mohsen *et al.*, 2011), sin embargo, también puede aumentar los problemas metabólicos, otros procesos de producción, enfermedades y reducir la fertilidad (Oltenacu y Broom, 2010), lo que debe ser considerado en los análisis económicos.

Algunos productos poliherbales han mostrado mejora en la fertilidad y reducción de mastitis, pero no presentan análisis económicos (Gutiérrez *et al.*, 2019), sin embargo, se puede hipotetizar que estos efectos podrían ser rentables. El impacto económico de la mastitis es significativo en costos directos e indirectos; se estima que por caso clínico de mastitis las pérdidas pueden oscilar entre 128 y 444 dólares estadounidenses (Rollin *et al.*, 2015; Cha *et al.*, 2011; Huijps *et al.*, 2008). La mejora de la fertilidad en el primer servicio podría reducir el intervalo entre partos; las pérdidas estimadas debido al aumento del intervalo entre partos están en el rango de \$ 5.77 USD a 6.11 / vaca / día (De Vries, 2006).

Hay abundante información que sugiere que los productos sintéticos pueden proporcionar nutrientes adicionales para vacas lecheras de alto rendimiento (Patton, 2010; Pinotti *et al.*, 2010; Sales *et al.*, 2010; Awawdeh, 2016). Sin embargo, en algunos países, el uso generalizado de estos productos por parte de los productores de leche no

es común porque la rentabilidad es baja. Por otro lado, son escasos los informes de unidades de producción que utilizan mezclas de nutrientes polihierbales.

El conocimiento de la rentabilidad relativa al suplementar vacas lecheras con aditivos polihierbales basado en los costos veterinarios es un tema importante para la toma de decisiones en los establos lecheros. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el impacto económico de suplementar a las vacas lecheras con mezclas de productos polihierbales suministrando conjugados de colina (BioCholine), lisina (OptiLysine) y metionina (OptiMethionine), considerando los costos de tratamientos veterinarios, los efectos nutracéuticos de las mezclas, el costo parcial y los retornos en la producción de leche.

MATERIAL Y MÉTODOS

Con la información de producción y salud de las vacas (Capítulo 1) así como los tratamientos veterinarios individuales (Da Fonseca *et al.*, 2004) se realizó un análisis económico, obteniendo de la base de datos del establo la información de cada vaca durante el período de alimentación experimental (de los 30 a los 120 DEL) y después del ensayo (de los 120 a los 210 DEL).

La eficiencia económica se calculó como la relación entre el precio de la leche producida antes, durante y después del periodo experimental, el costo de la suplementación con pellets, así como el costo de los tratamientos veterinarios (antibióticos, intramamarios y antiinflamatorios) vaca / día en dólares, según cifras de 2017 (US = 20 pesos mexicanos) (Mohsen *et al.*, 2011). El precio de venta de la leche fue de 0.3425 dólares EE.UU. por litro en el momento del estudio.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el paquete de software Rfd ANOVA (Górecki y Smaga, 2019).

La producción de leche se analizó como un diseño completamente aleatorizado y se probó la normalidad del número de tratamientos veterinarios, los costos se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Dalcq *et al.*, 2017).

RESULTADOS

En el período experimental, el grupo BC20 + L40 + M20 redujo sustancialmente el costo de los antibióticos y los tratamientos intramamarios por vaca. La evaluación posterior al experimento (efectos residuales) mostró que los grupos donde consumieron BC40 tuvieron los tratamientos con antibióticos más bajos y en el caso de los tratamientos intramamarios el grupo BC40+L80+M40 tuvieron el menor costo después del grupo control (Cuadro 1). Los tratamientos veterinarios acumulados por vaca mostraron que las que consumieron BC40 y BC20+L40+M20 redujeron el número de tratamientos, representando una reducción de 22.77 y 19.61 % respectivamente, pero los tratamientos con BC20 y BC40+L80+M40 incrementaron los tratamientos en 16.0 y 5.3% respectivamente en comparación con el grupo control.

Cuadro 1. Costos de tratamientos veterinarios (US \$ dólares) por vaca de acuerdo al aditivo herbal evaluado en un hato comercial.

	C	BC20	BC40	BC20-L40-M20	BC40-L80-M40	CV %	P
Período experimental (90 días)							
Antibióticos	30.34	30.14	17.52	5.83	47.65	239.12	0.80
Analgésicos	0.32	1.89	0.00	0.00	2.54	490.39	0.55
Antiinflamatorios	8.43	13.75	3.81	2.02	14.00	234.19	0.43
Glucogénicos	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	894.43	0.45
Hormonales	3.16	4.46	4.52	3.47	5.12	70.31	0.47
Intramamarios	6.64	7.34	3.31	0.38	11.93	296.30	0.42
Restaurativos	1.46	3.98	1.86	0.59	5.62	255.60	0.21
Vitaminas	3.35	3.91	2.06	0.26	5.84	302.11	0.37
Post experimento (90 días)							
Antibióticos	17.08	31.30	14.99	26.18	25.96	197.47	0.82
Analgésicos	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-
Antiinflamatorios	10.35	12.87	5.77	9.84	6.64	182.30	0.95
Glucogénicos	0.21	0.00	0.52	0.43	0.00	480.34	0.35
Hormonales	0.72	0.66	1.52	0.90	0.90	213.94	0.52
Intramamarios	2.73	6.11	4.72	5.43	3.05	235.84	0.65
Glucogénicos	6.01	7.57	5.05	13.22	2.76	177.39	0.44
Vitaminas	1.96	2.24	0.55	3.04	0.30	245.39	0.45

C: control, B: conjugados de colina (BioCholine), L: lisina (OptiLysine), M: metionina (OptiMethionine), CV: coeficiente de variación.

Cuadro 2. Eficiencia económica de vacas Holstein suplementadas con fosfatidilcolina (BC), metionina (M) y lisina (L) herbales

	C	BC20	B40	B20-L40-M20	B40-L80-M40	CV	<i>P</i>
Periodo Experimental (90 días)							
Leche kg/d	40.01	36.73	40.16	38.98	38.18	15.38	0.40
Pellet + Aditivo/vaca	0.103	0.185	0.369	0.424	0.847		
Costo en salud (US\$) / vaca	53.69	65.48	33.14	12.55	92.70	225.21	0.29
Costo parcial (US\$)	53.79	65.67	33.51	12.97	93.55		
Costo parcial (US\$) / kg leche	0.74	0.56	1.20	3.00	0.41		
Ingreso por leche (US\$/vaca/día)	13.70	12.58	13.75	13.35	13.08		
Mejora de ingresos (US)	0.00	-1.12	0.05	-0.35	-0.63		
Mejora de ingresos (%)	100.00	-8.20	0.37	-2.57	-4.57		
Post experimento (90 días)							
Leche kg/d	34.61	32.64	36.34	35.24	34.56	21.77	0.72
Pellet + Aditivo/vaca	0.103	0.185	0.369	0.424	0.847		
Costo en salud (US) / vaca	39.06	60.74	33.12	59.04	39.62	170.29	0.99
Costo parcial (US)	39.16	60.93	33.49	59.46	40.47		
Costo parcial (US)/kg leche	0.88	0.54	1.09	0.59	0.85		
Ingreso por leche (US\$/vaca/día)	11.85	11.18	12.45	12.07	11.84		
Mejora de ingresos (US)	0.00	-1.25	0.28	0.10	-1.06		
Mejora de ingresos (%)	100.00	-9.56	2.10	0.79	-8.10		

CV: coeficiente de variación.

A pesar de que la producción de leche no se vio afectada ($P>0.05$) por las combinaciones de aditivos, los valores de producción tienen un impacto en el análisis económico por los efectos residuales posteriores a la experimentación (Cuadro 2). Las diferencias en número de tratamientos e incidencia de enfermedad mostraron alta variación que repercutió en los costos de salud animal y no se detectaron diferencias estadísticas a pesar de observar que durante el período experimental en BC20+L40+M20 se redujo sustancialmente los costos en comparación con otros tratamientos (Cuadro 2).

El costo del pellet se vio influenciado por la dosis y el número de compuestos herbales incluidos, pero los ingresos de la leche fueron similares entre los tratamientos. Las vacas que consumieron 40 g de BC en el período experimental tuvieron la producción de leche numérica más alta seguida por el grupo control y después del experimento resultó en una mejora de ingresos del 2.1 % (Cuadro 2), lo que indica también un efecto residual en la salud animal. El tratamiento con BC20+L40+M20 resultó en una mejora de ingresos moderada (0.79 %).

DISCUSIÓN

La mayoría de los estudios económicos en ganado lechero coinciden en que los costos de alimentación son el componente principal de la producción de un litro de leche, y representan alrededor del 60 al 70 % del costo (Tatlidil y Akturk, 2009; Akturk *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2017) mientras que el costo laboral ocupa el segundo lugar, representando del 0.7 al 6.5 % (Türkyilmaz y Aral, 2002). Por el contrario, los costos de los antibióticos y veterinarios varían de un país a otro porque la proporción de los costos de producción puede variar según el país y el sistema de producción. Sin

embargo, existe un acuerdo general de que el control de la mastitis es un factor importante que contribuye a los costos relacionados con la salud animal (Halasa *et al.*, 2007) y puede representar entre el 11 y el 22 % de los costos veterinarios, pero se estima que causa pérdidas económicas dos veces más debido a la producción reducida y la leche descartada (Seegers *et al.*, 2003). El impacto económico puede ser mayor si se consideran los costos de las jeringas y los honorarios de los médicos veterinarios (Ghule *et al.*, 2012).

En la evaluación realizada, los costos asociados a los antibióticos, antiinflamatorios y tratamientos intramamarios en conjunto representaron el 81 % de los costos de salud por vaca. Los resultados de algunos tratamientos (Jouany y Morgavi, 2007) mostraron que algunos aditivos vegetales pueden reducir el impacto económico de las enfermedades en general con ventajas adicionales al reducir el desarrollo de microorganismos resistentes a los medicamentos. Los productos a base de poliherbales utilizados en esta evaluación se han utilizado en ovinos (Godínez-Cruz *et al.*, 2015, Rodríguez-Guerrero *et al.*, 2018, Martínez-Aispuro *et al.*, 2019) y en vacas lecheras (Cañada *et al.*, 2018; Mendoza *et al.*, 2019), en una evaluación plurianual redujo el número de abortos, mastitis, trastornos respiratorios y reemplazos bovinos (Gutiérrez *et al.*, 2019).

La información de algunos metabolitos reportados en las plantas de la mezcla, así como de otras plantas medicinales, puede ayudar a explicar los efectos biológicos observados en esta evaluación y en el informe plurianual. Se ha informado que una mezcla que contiene *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* ayuda en la prevención y en el tratamiento de la mastitis clínica (Das *et al.*, 2003) asociada con los

taninos hidrolizables que se encuentran en *E. officinalis*. *Ocimum sanctum* redujo el recuento de células somáticas en vacas lecheras administradas por vía oral y redujo la inflamación (Shafi *et al.*, 2016). Reshi *et al.* (2017) evaluaron la infusión intramamaria de extractos de plantas de *Fumaria indica* y *Adiantum capillus* contra la mastitis subclínica encontrando propiedades antibacterianas. Una revisión de plantas medicinales del Himalaya de Cachemira compilada por Mushtaq *et al.* (2018) indicaron que las plantas tradicionales tienen potencial antimicrobiano contra los patógenos de la mastitis.

Una ventaja de incluir mezclas poliherbales es la reducción del uso de antibióticos y la posibilidad reducida de alcanzar niveles medibles del antibiótico en la leche. Kirchhelle (2018) señaló que, en los sistemas de recolección masiva de leche de diferentes establos, la presencia de residuos de medicamentos en la leche de vaca podría contaminar miles de litros de leche, por lo que los antibióticos deben ser monitoreados con procedimientos sensibles (Cinquina *et al.*, 2003) que según la normativa legal puede tener impacto económico. La presencia de antiinflamatorios naturales en las mezclas del polihierbal favorece el bienestar animal que es un tema que debe ser abordado y promovido como una buena práctica de manejo que reduce el estrés metabólico y mejora la calidad de vida de las vacas lecheras. También permitiría el acceso a los mercados orgánicos de la leche que pueden ser más rentables.

Las mezclas poliherbales no aumentaron significativamente la producción de leche, pero el tratamiento con 40 g de BioCholine fue rentable. La mayoría de las evaluaciones de nutrientes o aditivos se han centrado en obtener una mayor rentabilidad por vaca maximizando la producción de leche (Dyaa *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2020), pero esto

puede considerarse una visión limitada y el enfoque debe dirigirse a maximizar el beneficio general. (Cho *et al.*, 2007; Dalcq *et al.*, 2017). Existen numerosos informes que complementan la colina protegida ruminalmente y que confirman que hay respuestas de dosis en las que la producción puede aumentarse hasta en un 10 % (Pinotti *et al.*, 2010; Sales *et al.*, 2010). Pero hay pocos estudios que complementen la colina herbal, en uno la producción de vacas en pastoreo aumentó en un 21 % (Cañada *et al.*, 2018) pero en vacas lactantes de alto rendimiento se informó una mejora de solo 1.57 % (Gutiérrez *et al.*, 2019). Existen importantes diferencias entre el cloruro de colina protegido ruminalmente descrito por De-Veth *et al.* (2016) y los conjugados de colina total en la mezcla polih herbal en el metabolismo que no permiten comparaciones directas entre las dos fuentes que fisiológicamente aportan fosfatidilcolina al cuerpo (Martínez-Aispuro *et al.*, 2019).

La respuesta observada con mezclas de polih herbal que contiene colina podría atribuirse a las funciones de los nutrientes que se ha demostrado mejoran el estado inmuno-metabólico en las vacas lecheras (Vailati-Riboni *et al.*, 2017) así como en la capacidad antioxidante (Sun *et al.*, 2016) que ha permitido reducir los problemas metabólicos en general y la morbilidad (Lima *et al.*, 2012). El efecto residual de BC40 sobre la producción de leche podría explicarse por las propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes de los aditivos herbales sobre la salud de la glándula mamaria (Walkenhorst *et al.*, 2020) al reducir la muerte celular en el epitelio secretor de leche y en el largo plazo los efectos negativos sobre la lactancia en vacas con mastitis (Capuco *et al.*, 2003). Esto coincide con Gutiérrez *et al.* (2019) quienes informaron una menor incidencia de mastitis y una mayor producción de leche en vacas suplementadas con

colina a base de hierbas. En la misma colina herbal evaluada, Mendoza *et al.* (2019) encontraron 4-vinilguaiacol y undecano en los compuestos volátiles de la mezcla de polialgas; el primero tiene propiedades antioxidantes (Esatbeyoglu *et al.*, 2015) y el segundo tiene actividad antiinflamatoria (Fa-Liang *et al.*, 2017).

Las mezclas poliherbales pueden proporcionar constituyentes que mejoran la fermentación ruminal; la cinética de la producción de gas *in vitro* (Rodríguez-Guerrero *et al.*, 2018) modificada por BioCholine y los metabolitos secundarios pueden tener efectos beneficiosos en la fermentación por diferentes mecanismos de acción revisados por Jouany y Morgavi (2007). Sin embargo, el incremento en los costos y la falta de respuesta cuando los productos a base de hierbas se combinaron en dosis altas (BC40+L80+M40), confirma la observación de Jouany y Morgavi (2007) de que la dosis excesiva de metabolitos secundarios de las plantas puede inducir las respuestas negativas en general, la mayoría de los estudios muestran efectos beneficiosos de las hierbas sobre la ingesta de alimento, las funciones inmunitarias, la salud, la fermentación ruminal y la productividad de los rumiantes (Frankič *et al.*, 2009), por lo que es importante continuar con las evaluaciones de respuesta a la dosis de los productos a base de poliherbales y otras plantas empleadas en la alimentación de ganado lechero.

CONCLUSIONES

Las vacas suplementadas con 40 g de la mezcla de poliherbales que contienen conjugados de colina tuvieron la mejor producción de leche numéricamente y el menor

número de costos en salud en el período post-experimental, lo que resultó en el costo más bajo relacionado con la salud animal por litro de leche.

REFERENCIAS

Akturk, D.; Bayramoğlu, Z.; Savran, F.; Tatlidil, F. F. 2010. The factors affecting milk production and milk production cost. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Der.* 16: 329-335.

Awawdeh, M. S. 2016. Rumen-protected methionine and lysine: effects on milk production and plasma amino acids of dairy cows with reference to metabolisable protein status. *J. Dairy Res.* 83: 151-155.

Cañada, L. M. G.; Meráz-Romero, E.; Mendoza-Martínez, D. G.; Villagrán-Vélez, B.; Castillo-Mata, A. D. 2018. Efecto del nivel de colina herbal en la producción y composición de leche en ganado lechero en pastoreo. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 26:82.

Capuco, A. V.; Ellis, E. S.; Hale, A. S.; Long, E.; Erdman, A. R.; Zhao, X.; Paape, J. M. 2003. Lactation persistency: Insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 3): 18-31.

Cha, E., Bar, D.; Hertl A. J.; Tauer, W. L.; Bennett, G.; González, N. R.; Schukken, H. Y.; Welcome, L.; Gröhn, T. Y. 2011. The cost and management of different types of clinical mastitis in dairy cows estimated by dynamic programming. *J. Dairy Sci.* 94:4476-4487.

Cho, J., Overton, R. T.; Schwab, G. C.; Tauer, W. L. 2007. Determining the amount of rumen-protected methionine supplement that corresponds to the optimal levels

of methionine in metabolizable protein for maximizing milk protein production and profit on dairy farms. *J. Dairy Sci.* 90: 4908-4916.

Cinquina, A. L., Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R. 2003. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J. Chromatogr. A.* 987(1-2): 227-233.

Da Fonseca, L. F. L.; Mazza-Rodrigues, H. P.; Veiga-dos Santos, M.; Pinto-Lima, A.; de Souza-Lucci, C. 2004. Supplementation of dairy cows with propylene glycol during the periparturient period: effects on body condition score, milk yield, first estrus post-partum, beta-hydroxybutyrate, non-esterified fatty acids and glucose concentrations. *Cienc. Rural.* 34(3): 897-903.

Dalcq, A. C.; Beckers, Y.; Mayeres, P.; Reding, E. 2017. The feeding system impacts relationships between calving interval and economic results of dairy farms. *Animal.* 12: 1662-1671.

Das, P. K., Das, R. M.; Acharya, C. K.; Ray, K. S. 2003. Evaluation of herbal immunostimulant "Immu-21" in prevention and treatment of bovine clinical mastitis. *Phytomedica.* 4: 13-20.

De Veth, M. J.; Artegoitia, M. V.; Campagna, R. S.; Lapierre, H.; Harte, F.; Girard, L. C. 2016. Choline absorption and evaluation of bioavailability markers when supplementing choline to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99: 9732-9744.

De Vries, A. 2006. Economic Value of Pregnancy in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89(19): 3876-3885.

- Dubey, M., Singh, P. V.; Pandey, K. R.; Chaubey, K. A. 2017. Economic analysis of feeding management and milk production at the university dairy farm. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 6: 480-486.
- Dyaa, E. D. A. M., Borhami, E. B.; El-Shazly A. K.; Sallam, A. M. 2013. Effect of dietary supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactating dairy cows. *J. Agric. Sci.* 5: 146-155.
- Esatbeyoglu, T.; Ulbrich, K.; Rehberg, C.; Rohn, S.; Rimbach, G. 2015. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food Funct.* 6: 887-893.
- Fa-Liang, A.; Dong-Mei, S.; Rui-Jun, L.; Miao-Miao, Z.; Ming-Hua, Y.; Yong, Y.; Ling-Yi, K.; Jun, L. 2017. Walrobsins A and B, two anti-inflammatory limonoids from root barks of *Walsura robusta*. *Org. Lett.* 19: 4568–4571.
- Frankič, T.; Voljč, V.; Salobir, J.; Rezar, V. 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agric. Slov.* 94: 95-102.
- Ghule, A., Verma, K. N.; Cahuhan, K. A., Sawale, D. P. 2012. An economic analysis of investment pattern cost of milk production and profitability of commercial dairy farms in maharashtra. *Indian J. Dairy Sci.* 65(4): 329-336.
- Godínez-Cruz, J.; Cifuentes-Lopez, O.; Cayetano, J.; Lee-Rangel, H.; Mendoza, G.; Vazquez, A.; Roque, A. 2015. Effect of choline inclusion on lamb performance and meat characteristics. *J. Anim. Sci.* 93:766.

- Górecki, S. T.; Smaga Ł. 2019. fdANOVA: An R software package for analysis of variance for univariate and multivariate functional data. *Comput. Stat.* 34:571–597.
- Gutiérrez, A. R.; Gutiérrez, A.; Sánchez, C.; Mendoza, D. G. 2019. Effect of including herbal choline in the diet of a dairy herd; a multiyear evaluation. *Emir. J. Food Agric.* 31(6): 477-481.
- Halasa, T.; Huipjs, K.; Østerås, O.; Hogeveen, H. 2007. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Veterinary Q.* 29: 18-31.
- Huijps, K.; Lam, J. T.; Hogeveen, H. 2008. Costs of mastitis: facts and perception. *J. Dairy Res.* 75(1): 113-120.
- Jouany, J. P.; Morgavi, P. D. 2007. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal.* 1: 1443-1466.
- Kirchhelle, C. 2018. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017). *Palgrave Commun.* 4:96.
- Lima, F. S.; Sá Filho, M. F.; Greco, L. F.; Santos, J. E. P. 2012. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *Vet. J.* 193: 140-145.
- Martínez-Aispuro, J. A., Mendoza, G. D.; Cordero-Mora, J. L.; Ayala-Monter M. A.; Sánchez-Torres, M. T.; Figueroa-Velasco, J. L.; Vázquez-Silva, G.; Gloria-Trujillo, A. 2019. Evaluation of an herbal choline feed plant additive in lamb feedlot rations. *R. Bras. Zootec.* 48: 20190020.

- Mendoza, G. D.; Oviedo, M. F.; Pinos, J. M.; Lee-Rangel, H. A.; Vázquez, A.; Flores, R.; Pérez, F.; Roque, A.; Cifuentes, O. 2020. Milk production in dairy cows supplemented with herbal choline and methionine. *Rev. Fac. UNCUYO*. 52(1): 332-343.
- Mohsen, M. K.; Gaafar, H. M. A.; Khalafalla, M. M.; Shitta, A. A.; Yousif, A. M. 2011. Effect of rumen protected choline supplementation on digestibility, rumen activity and milk yield in lactating Friesian cows. *Slovak J. Anim. Sci.* 44(1): 13-20.
- Mushtaq, S. A.; Shah, M.; Shah, A.; Lone, S. A.; Hussain, A.; Hassan, Q. P.; Ali, M. N. 2018. Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. *Microb. Pathog.* 114: 357-361.
- Oltenacu, P. A.; Broom, D. M. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Anim. Welf.* 19: 39-49.
- Patton, R. A. 2010. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93: 2105-2118.
- Pinotti, L.; Polidori, C.; Campagnoli, A.; Dell'Orto, V.; Baldi, A. 2010. A meta-analysis of the effects of rumen protected choline supplementation on milk production in dairy cows. *EAAP Sci. Ser.* 127: 321-322.
- Reshi, I. A.; Sarkar, T. K.; Malik, H.; Muhee, A.; Shoukat, S. 2017. Efficacy of *Fumaria indica*, *Nepeta cataria* and *Adiantum capillus* crude aqueous extracts in comparison to cefuroxime in sub-clinical cases of bovine mastitis. *Int. J. Livest. Res.* 7: 100-107.

- Rodríguez-Guerrero, V., Lizarazo, C. A.; Ferraro, I. S.; Suárez, N.; Miranda, L. A.; Mendoza, G. D. 2018. Effect of herbal choline and rumen-protected methionine on lamb performance and blood metabolites. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 48: 427-434.
- Rollin, E.; Dhuyvetter, K. C.; Overton, M. W. 2015. The cost of clinical mastitis in the first 30 days of lactation: An economic modeling tool. *Prev. Vet. Med.* 122(3): 257-264.
- Sales, J., Homolka, P.; Koukolová, V. 2010. Effect of dietary rumen-protected choline on milk production of dairy cows: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93: 3746-3754.
- Seegers, H.; Fourichon, C.; Beaudeau, F. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34: 475-491.
- Shafi, T. A.; Bansal, B. K.; Gupta, D. K.; Nayyar, A. 2016. Evaluation of immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* in bovine subclinical mastitis. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 40: 352-358.
- Sun, F.; Cao, Y.; Cai, C.; Li, S.; Yu, C.; Yao, J. 2016. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS One.* 11(8): e0160659.
- Tatlidil, F. F.; Aktürk, D. 2009. Comparative analysis of dairy cattle-breeding farms on member and non-member of breeders association. *Agric. Syst.* 4: 36-40.
- Türkyilmaz, M. K.; Aral, S. 2002. Efficiency of resource usage in dairy herds aydin province and their marketing and organizational problems. *Kafkas Univ. Vet. Med. J.* 8: 41-48.

Vailati-Riboni, M.; Zhou, Z.; Jacometo, C. B.; Minuti, A.; Trevisi, E.; Luchini, D. N.; Loor, J. J. 2017. Supplementation with rumen-protected methionine or choline during the transition period influences whole-blood immune response in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100: 3958-3968.

Walkenhorst, M.; Leiber, F.; Maeschli, A.; Kapp, A.; Spengler-Neff, A.; Faleschini, M.; Garo, E.; Hamburger, M.; Potterat, O.; Mayer, P.; Graf-Schiller, S.; Bieber, A. 2020. A multicomponent herbal feed additive improves somatic cell counts in dairy cows - a two stage, multicentre, placebo-controlled long-term on-farm trial. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 104(2): 439-452.

CONCLUSIONES GENERALES

La identificación de compuestos volátiles nos permite comprender los beneficios adicionales de los productos herbales en la salud, y dar información sobre cómo alimentar con estos productos de forma estratégica para que el ganado no los perciba en el alimento y mejore su consumo. También permiten complementar las explicaciones e hipótesis de por qué tienen protección contra la degradación ruminal.

Aunque no fue posible estimar una dosis óptima de BioCholine para la producción de leche, nuestra recomendación es que la dosis comercial debe estar entre 10 y 15 g / día para vacas especializadas. Los beneficios de los productos herbales en la alimentación del ganado lechero deben ser compartidos con los nutricionistas de campo, destacándose los aportes nutracéuticos que normalmente no se consideran cuando se equilibran las raciones en esta especie.

Debido a la gran cantidad de compuestos volátiles en los productos herbales, se sugiere el uso de estos productos en raciones integrales y no en concentrados que se suplementen por separado para evitar rechazos. No se recomienda la inclusión en combinación de varios productos a base de hierbas en un suplemento para ganado lechero. En ese caso conviene diluirlos mejor en la ración totalmente mezclada.

La identificación de compuestos volátiles permitió identificar muchos componentes con propiedades nutracéuticas beneficiosas. Sin embargo, también se detectaron algunos compuestos indeseables que pueden ser indicadores de contaminación quizás en el área de cultivo de las plantas. Sin embargo, estos compuestos no representan ningún riesgo para el ganado según las referencias bibliográficas.

Los resultados de OptiMethionine y OptiLysine, sugieren que, para poder utilizarlos en la alimentación del ganado lechero, debería reconsiderarse su evaluación con un enfoque en la reducción parcial de los aminoácidos sintéticos. Es probable que la dosis óptima para el ganado lechero sea menor que la utilizada en este experimento.

La experimentación en unidades comerciales presenta desafíos y problemas que no necesariamente son los mejores, pero a la vez representan las condiciones de campo que los productores requieren para la transferencia de tecnología.

Se aconseja dirigir la atención a los aditivos herbales como nutracéuticos, ya que pueden desempeñar un papel importante en la rentabilidad y productividad de la granja al mejorar la salud.

REFERENCIAS

- Baldi, A.; Pinotti, L. 2006. Choline metabolism in high-producing dairy cows; metabolic and nutritional basis. *Can. J. Anim. Sci.* 86: 207-212.
- Godínez-Cruz, J.; Cifuentes-López, O.; Cayetano, J.; Lee-Rangel, H. A.; Mendoza, G.; Vázquez, A.; Roque, A. 2015. Effect of choline inclusion on lamb performance and meat characteristics. *J. Anim. Sci.* 93 (Suppl. 3): 766 (Abstr).
- Grummer, R. R. 2013. Choline: A Limiting Nutrient for Transition Dairy Cows. *Proceedings of the Florida Ruminant Nutrition Conference.* p. 22-29.
- Harpaz, S. 2005. L-carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition. A review. *Aquaculture.* 249: 3-2.
- Lobley, G. E.; Connell, A.; Revell, D. 1996. The importance of transmethylation reactions to methionine metabolism in sheep: effects of supplementation with creatine and choline. *British Journal of Nutrition.* 75: 47-56.
- Mohsen, M. K.; Gaafar, A. M. H.; Khalafalla, M. M.; Shitta, A. A.; Yousif, M. A. 2011. Effect of rumen protected choline supplementation on digestibility, rumen activity and milk yield in lactating Friesian cows. *Slovak J. Anim. Sci.* 44(1): 13-20.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* National Research Council. The National Academies Press, Washington, DC, USA.
- Pinotti, L.; Polidori, C.; Campagnoli, A.; Dell'Orto, V.; Baldi, A. 2010. A meta-analysis of the effects of rumen protected choline supplementation on milk production in dairy cows. *EAAP Sci. Ser.* 127: 321-322.

Santos, J. E. P.; Lima, F. S. 2009. Feeding rumen-protected choline to transition dairy cows. Department of Animal Sciences, College of Veterinary Medicine. University of Florida. dairy.ifas.ufl.edu/rns/2009/Santos.pdf.

Xu, S. C.; Zhu, S. J.; Wang, J.; Bi, L. W.; Chen, Y. X.; Lu, Y. J.; Gu, Y.; Zhao, Z. D. 2017. Design, synthesis and evaluation of novel cis-p-menthane type Schiff base compounds as effective herbicides. *Chin. Chem. Lett.* 28: 1509-1513.