UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE FITOBIÓTICOS PARA REDUCIR LAS EMISIONES DE METANO RUMINAL

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

M. EN C. KARLA MITZUE VILLALOBOS ARIAS

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR: DR. ADRIAN GLORIA TRUJILLO

CO DIRECTORA: DRA. MARÍA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ

ASESOR: DR. PEDRO ABEL HERNÁNDEZ GARCÍA

CUIDAD DE MÉXICO JULIO 2026

RESUMEN

La producción de metano entérico en rumiantes representa un desafío ambiental y productivo, debido a su contribución al cambio climático y a las pérdidas de energía asociadas con la fermentación ruminal. En esta tesis se evaluó el potencial de los metabolitos secundarios de origen vegetal como estrategia para mitigar las emisiones de metano y mejorar la eficiencia productiva. En el primer capítulo se caracterizó químicamente un aditivo poliherbal elaborado con *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* y se evaluó su efecto sobre el desempeño productivo, la microbiota ruminal y la retención de energía en corderos alimentados con dietas de engorda. En el segundo capítulo se realizó un metaanálisis para determinar el efecto de diferentes metabolitos secundarios administrados como aditivos vegetales sobre las emisiones de metano, el rendimiento productivo y los parámetros de fermentación ruminal en bovinos de carne. Los resultados muestran que los aditivos vegetales modifican la microbiota y la fermentación ruminal, favoreciendo una utilización más eficiente de la energía y reduciendo la producción de metano. En conjunto, los hallazgos respaldan el uso de metabolitos secundarios como una alternativa nutricional sostenible para mejorar la productividad y disminuir el impacto ambiental de los sistemas de producción de rumiantes.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, rumiantes productores de carne, calentamiento global.

Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

EVALUACIÓN DE FITOBIÓTICOS PARA REDUCIR LAS EMISIONES DE METANO RUMINAL

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité tutoral 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. Adrián Gloria Trujillo

Co Directora
Dra. María Eugenia de la Torre Hernández

Asesor
Dr. Pedro Abel Hernández García

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL 7

REFERENCIAS 9

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN 12

HIPOTESIS 12

OBJETIVO GENERAL 13

OBJETIVOS ESPECIFICOS 13

CAPITULO 1. 15

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y MICROBIOTA RUMINAL EN CORDEROS DE ENGORDA SUPLEMENTADOS CON UN ADITIVO POLIHERBAL 15

RESUMEN 15

INTRODUCCIÓN 17

MATERIALES Y METODOS 19

- Caracterización del aditivo poliherbal 19
- Tratamientos y alimentación de corderos 19
- Toma de muestras y extracción de ADN 21
- Secuenciación parcial del gen ARNr 16S 21
- Análisis bioinformático 22
- Análisis estadístico 23

RESULTADOS 23

- Determinación del aditivo poliherbal 23
- Comportamiento productivo 24
- Procesamiento de secuencias 25
- Análisis de Diversidad Alfa y Beta 25
- Análisis metagenómico 28

DISCUSIÓN 31

CONCLUSIONES 38

REFERENCIAS 38

CAPITULO 2. 52

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO, EL RENDIMIENTO

PRODUCTIVO Y EL PERFIL DE FERMENTACIÓN EN EL GANADO BOVINO DE CARNE: UN METAANÁLISIS **52**
RESUMEN **52**
INTRODUCCIÓN **55**
MATERIALES Y MÉTODOS **58**
Búsqueda bibliográfica y criterios de selección **58**
Extracción de datos **60**
Análisis estadístico **60**
Sesgo de publicación y "trim all fill" **61**
Meta-regresión **61**
RESULTADOS **62**
Búsqueda de información **62**
Composición de la dieta **68**
Comparación, en subgrupos, del efecto de los metabolitos secundarios sobre las emisiones de metano, la fermentación ruminal y la producción animal **69**
Efecto de los metabolitos secundarios en la producción de metano 69
Efecto de los metabolitos secundarios sobre los parámetros de fermentación 72
Efecto de los metabolitos secundarios en la producción animal 73
Análisis de meta-regresión **77**
DISCUSIÓN **81**
Efecto de los metabolitos secundarios en la producción de metano **81**
Taninos 82
Flavonoides y monoterpenos 84
Efecto de los metabolitos secundarios sobre los parámetros de fermentación **85**
Taninos 85
Terpenos y terpenoides 86
Compuestos fenólicos 86
Efecto de los metabolitos secundarios sobre el rendimiento de los animales y la ingesta de nutrientes **87**
Taninos 87
Flavonoides 88
Fuentes de heterogeneidad en la respuesta de los metabolitos secundarios

de origen vegetal **89**
Sesgo de publicación **91**
CONCLUSIONES **92**
Declaración sobre la disponibilidad de los datos **93**
REFERENCIAS **93**
CONCLUSIONES GENERALES **110**
MATERIAL COMPLEMENTARIO **111**

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los rumiantes fueron domesticados para la producción de carne, leche y fibras, y tienen la capacidad, mediante un reservorio de microorganismos en rumen, de convertir biomasa proveniente de pastizales, pastos y residuos de cultivos o subproductos, en ácidos grasos volátiles (principal fuente de energía para estos animales) (Reinhardt y Faris, 2014). La energía fermentable y la proteína degradable en rumen son utilizados para la síntesis de proteína microbiana, la cual en conjunto con los aminoácidos digestibles en intestino provenientes de la proteína no degradable en rumen aseguran el mantenimiento, crecimiento y producción de los rumiantes (Das *et al*., 2014).

La eficiencia alimenticia se define como la ganancia de peso de un animal por cantidad de alimento consumido. Un animal más eficiente consume menos alimento y la vez mantiene el mismo nivel de producción o lo aumenta (Claffey *et al*., 2018). En los rumiantes, como principales emisores de metano, se puede medir su eficiencia en función del metano producido. Animales altamente eficientes producen menos metano y al consumir menos alimento producen menos estiércol (Kenny *et al*., 2018). La industria ganadera produce a nivel mundial el 30% de las emisiones de metano a partir de la fermentación entérica, lo que influye de forma importante en el calentamiento global (Rust y Rust, 2013). El metano (8 – 9% de las pérdidas de energía del alimento consumido) es producido por microrganismos del dominio *Archaea* quienes utilizan CO_2 como su aceptor terminal de electrones en la respiración anaeróbica convirtiéndolo en CH_4 y utilizando como donador de electrones H_2 (Bonilla y Lemus, 2012; Olijhoek *et al*., 2020). Se ha buscado manipular la dieta para reducir la cantidad producida de gases de efecto invernadero (principalmente el metano), sin que se

afecte la producción animal y la calidad de los alimentos (Osorio *et al*., 2018). La dieta es el principal factor modulador de la microbiota en el tracto digestivo (Moszak *et al*., 2020), la cual es un conjunto de microorganismos que habitan un ambiente, huésped o partes del huésped y que tiene un rol cuantificable sobre la eficiencia productiva (carne y leche) en rumiantes por lo que actúa como una interfaz clave entre el ambiente y el hospedero (Terry *et al*., 2021; Setubal y Dias-Nieto, 2022).

Estos microorganismos producen ácidos grasos de cadena corta, ácidos grasos de cadena ramificada, aminoácidos, aminas biógenas, incretinas, hormonas y neurotransmisores en el hospedero (Cryan *et al*., 2019). Wessels (2022) señala que el papel metabólico de la microbiota le permite contribuir en el metabolismo del animal al influenciar la salud, bienestar, productividad y consumo de alimento.

La microbiota se puede estudiar con herramientas de secuenciación de DNA para analizar la diversidad de genomas microbianos o metagenoma (todo el material genético encontrado en una muestra biológica que consiste en múltiples genomas de organismos individuales) (Cortés-López *et al*., 2020; Pawar *et al*., 2023).

Una forma de modular la microbiota ruminal es mediante fitobióticos (promotores de crecimiento del tipo no antibiótico como mezclas de plantas o extractos herbales). Estos aditivos han demostrado incrementar el rendimiento productivo, el bienestar animal y la calidad de los productos obtenidos (Bombik *et al*., 2012) al mejorar el estatus nutricional y reducir la producción de metano. Con base en lo anterior, el estudio de los herbales ayudaría a identificar sus mecanismos de acción al interactuar con los microorganismos que habitan el reservorio ruminal y su impacto en la eficiencia productiva y la producción de gases de efecto invernadero (Durmic *et al*., 2014).

REFERENCIAS

Bombik, T., Bombik, E., Frankowska, A., Trawińska, B., Saba, L. (2012). Effect of herbal extracts on some haematological parameters of calves during rearing. Journal of Veterinary Research, 56(4), 655-658.

Bonilla, C.A.J., Lemus, F.C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. Rev. Mex. Cienc. Pec. 3(2): 215-246.

Claffey, N.A., Fahey, A.G., Gkarane, V., Moloney, A.P., Monahan, F.J., Diskin, M.G. 2018. Effect of breed and castration on production and carcass traits of male lambs following an intensive finishing period. Translational Anim. Sci. 2: 407 – 418.

Cortés-López, N.G., Ordóñez-Baquera, P.L., Domínguez-Viveros, J. 2020. Molecular tools used for metagenomic analysis. Review. Rev. Mex. Cienc. Pec. 11(4): 1150-1173.

Cryan JF, O'Riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu KV, Bastiaanssen TFS, Boehme M, Codagnone MG, Cussotto S, Fulling C, Golubeva AV, Guzzetta KE, Jaggar M, Long-Smith CM, Lyte JM, Martin JA, Molinero-Perez A, Moloney G, Morelli E, Morillas E, O´Connor R, Cruz-Pereira JS, Peterson VL, Rea K, Ritz NL, Sherwin E, Spichak S, Teichman EM, van de Wouw M, Ventura-Silva AP, Wallace-Fitzsimons SE, Hyland N, Clarke G, Dinan TG. 2019. The Microbiota-Gut-Brain Axis. Physiological Reviews 99:1877–2013.

Das, L.K., Kundu, S.S., Kumar, D., Datt, C. 2014. Metabolizable protein systems in ruminant nutrition: A review. Vet. World 7(8): 622-629.

Durmic, Z., Moate, P. J., Eckard, R., Revell, D. K., Williams, R., Vercoe, P. E. (2014).

In vitro screening of selected feed additives, plant essential oils and plant extracts for rumen methane mitigation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 94(6), 1191-1196.

Kenny, D.A., Fitzsimons, C., Waters, S.M., Mcgee, M. 2018. Invited review: Improving feed efficiency of beef cattle–the current state of the art and future challenges. Animal 12:1815–1826.

Moszak, M., Szulinska, M., Bogdanski, P. 2020. You are what you eat – The relationship between diet, microbiota, and metabolic disorders – A review. Nutrients 12(4):1096.

Olijhoek, D.W., Difford, G.F., Lund, P., Løvendahl, P. 2020. Phenotypic Modeling of Residual Feed Intake Using Physical Activity and Methane Production as Energy Sinks. J. Dairy Sci. 103:6967–6981.

Osorio Terán A. I., Mendoza Martínez G. D., Miranda Romero, L. A., Martínez Gómez, D., Hernández García, P.A. (2018). Evaluación del efecto de monensina y propionato de calcio sobre producción metano y bacterias ruminales. Avances de la Investigación Sobre Producción Animal y Seguridad Alimentaria en México, Primera Edición. Morelia, Michoacán México pp. 769.

Pawar, S.S., Mohanapure, A.P., Brahmane, P.M., Bhendarkar, P.M., Nirmale, V.A., Kurade, PN. 2023. Metagenomics: A novel tool for livestock and poultry improvement: A review. Agricultural Rev. 44(2):264-268.

Reinhardt, C., Faris, B. 2014. Ruminants. In Encyclopedia of Meta Sciences. Eds. Dikeman, M., Devine, C. Volume 2. Academic Press. pp. 471- 479.

Setubal, C.J., Dias-Neto, E. 2022. Microbiomes. In Brenner´s Encyclopedia of Genetics. Third edition. Elsevier.

Terry, A.S., Basarab, A.J., Guan, L.L., McAllister, A.T. 2021. Strategies to improve the efficiency of beef cattle production. Can. J. Anim. Sci. 101:1-19.

Wessels, G.A. 2022. Influence of the gut microbiome on feed intake of farm animals. Microorganisms 10:1305.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Se puede modular la microbiota ruminal de corderos en finalización a través del uso de un poliherbal con *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* en la dieta?

¿Cuáles son los metabolitos secundarios que generan efectos sobre las variables productivas, fermentativas y la producción de metano en bovinos de carne?

¿Cómo afecta la dosis y presentación de los metabolitos secundarios en diferentes dietas sobre el desempeño productivo, la fermentación ruminal y la producción de metano en bovinos de carne?

HIPOTESIS

- El uso de un fitobiótico hecho a base de *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* en dietas de finalización de corderos mejorará las variables productivas reduciendo las emisiones de metano, mediante la disminución de arqueas metanogénicas en el rumen.
- La inclusión de metabolitos secundarios de origen vegetal en la dieta de bovinos de carne modulará la fermentación ruminal, reduciendo la producción de metano entérico sin afectar negativamente el desempeño productivo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el uso de un aditivo herbal y de algunos metabolitos secundarios en rumiantes productores de carne sobre el comportamiento productivo, perfil de fermentación y el perfil metagenómico y su relación con la producción de metano.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar los metabolitos secundarios por cromatografía de gases acoplado a masas de un aditivo herbal a base de *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis*.

- Evaluar la inclusión de un aditivo herbal a base de *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* en el comportamiento productivo de corderos alimentados con una dieta rica en concentrado.

- Caracterizar las poblaciones bacterianas en corderos suplementados con un aditivo herbal a base de *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* y una dieta rica en concentrado mediante secuenciación masiva.

- Identificar las principales correlaciones entre el desempeño productivo y poblaciones bacterianas ruminales de corderos alimentados con una dieta rica en concentrado y suplementados con un aditivo herbal a base de *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis*.

- Conocer el efecto de los principales metabolitos secundarios aportados por aditivos herbales mediante un análisis de meta regresión con las variables productivas, fermentativas y de emisiones de metano en rumiantes productores de carne.

- Identificar el potencial anti metanogénico de los metabolitos secundarios aportados por aditivos herbales y los principales moderadores que regulan su respuesta en bovinos productores de carne.

CAPITULO 1.

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y MICROBIOTA RUMINAL EN CORDEROS DE ENGORDA SUPLEMENTADOS CON UN ADITIVO POLIHERBAL

RESUMEN

Los aditivos herbales han demostrado efectos positivos en la salud de los rumiantes y el comportamiento productivo al influir en la microbiota ruminal. Se analizaron los efectos de un aditivo poliherbal en la microbiota ruminal y se determinaron sus metabolitos secundarios mediante cromatografía de gases acoplado a masas. Se realizó un ensayo experimental con dos tratamientos: Testigo (dieta basal) y Poliherbal (dieta basal + 0.14% del aditivo herbal) durante 15 días, con cuatro y cinco corderos por tratamiento, respectivamente, en un diseño completamente al azar. Se evaluó el consumo de materia seca, los cambios en el peso vivo, la conversión alimenticia y la energía retenida. Para el rendimiento animal, se utilizó el peso inicial como covariable. Se recolectaron muestras de líquido ruminal para extraer ADN metagenómico para secuenciar la región V3-V4 del gen 16S rRNA. Entre los metabolitos detectados, los más notables fueron timol, eugenol, ácido *cis*-9-octadecenoico, vainillina, óxido de cariofileno, 2,3,3-trimetil-1-penteno, oplopenona, 3,4-dimetoxicinamaldehído y tetradecanal. El poliherbal promovió la ganancia de peso (P = 0.065) y la retención de energía (P = 0.064), mejorando así la conversión alimenticia (P = 0.039). El análisis metagenómico mostró que el poliherbal redujo la abundancia relativa de *Methanobacteriaceae* (72.8 %; P = 0.098), Clostridiales familia XIII (60 %; P = 0.098) y *Ruminococcaceae* (70.59 %; P = 0.098). En conclusión, los metabolitos secundarios del poliherbal mejoraron el comportamiento productivo y modificaron la abundancia relativa de las familias microbianas involucradas en el balance de hidrógeno en rumen.

Palabras clave: herbales, metagenómica, corderos, fermentación ruminal, reducción de metano.

ABSTRACT

Herbal additives have demonstrated positive effects on ruminant health and animal performance by influencing the ruminal microbiota. The effects of a polyherbal additive on the ruminal microbiota were analyzed, and its secondary metabolites were determined by gas chromatography-mass spectrophotometry. An experimental trial was conducted with two treatments: Control (basal diet) and Polyherbal (basal diet supplemented with 0.14% polyherbal additive) for 15 days, with four and five lambs per treatment, respectively, in a completely randomized design. Dry matter intake, changes in body weight, feed conversion, and retained energy were evaluated. For animal performance, initial body weight was used as a covariate. Rumen fluid samples were collected to extract metagenomic DNA for sequencing the V3-V4 region of the 16S rRNA gene. Among the metabolites detected, the most notable were thymol, eugenol, cis-9-octadecenoic acid, vanillin, caryophyllene oxide, 2,3,3-trimethyl-1-pentene, oplopenone, 3,4-dimethoxycinnamaldehyde, and tetradecanal. The polyherbal additive promote weight gain (P=0.065) and energy retention (P=0.064), thereby improving feed conversion (P=0.039). Metagenomic analysis showed that the polyherbal reduced the relative abundance of *Methanobacteriaceae* (72.8%; P=0.098), Clostridiales family XIII (60%; P=0.098), and *Ruminococcaceae* (70.59%; P=0.098). In conclusion, secondary metabolites of the polyherbal improve animal performance and modify the abundance of microbial families involved in ruminal hydrogen balance.

Keywords: Herbal additives; metagenomics; lambs; ruminal fermentation; methane reduction.

INTRODUCCIÓN

La ganadería contribuye sustancialmente a las emisiones de gases de efecto invernadero, representando el 14.5 % del total de emisiones antropogénicas (50 % de metano, 26 % de CO_2 y 24 % de óxido nitroso) (Cheng *et al*., 2022). Después del ganado bovino y el búfalo, los borregos son el tercer mayor productor de metano entre los rumiantes (FAOSTAT, 2020), con el 6.4 % de la producción entérica total (Patra, 2014). El metano es un producto generado en el rumen por arqueas metanogénicas (Khairunisa *et al*., 2023) a partir del CO_2 y el H_2 derivados de la fermentación de sustratos como la glucosa (Mendoza-Martínez, 2008). Su formación se asocia negativamente con la eficiencia energética y los costos de alimentación, ya que representa pérdidas del 6 al 12 % de la energía bruta consumida por el animal (Pinares-Patiño *et al*., 2013). Se han reportado resultados positivos en los parámetros productivos al incluir aditivos poliherbales estandarizados y fitobióticos en dietas de finalización para corderos (Razo *et al*., 2020; Orzuna-Orzuna *et al*., 2021; Martínez-Aispuro *et al*., 2022). Ornaghi *et al*. (2020) consideraron los herbales como una posible alternativa para reducir la acidosis ruminal debido a sus efectos antimicrobianos, que podrían actuar modificando la proporción de familias microbianas en el rumen y regulando la fermentación en dietas ricas en granos.

Razo *et al*. (2020) reportaron aumentos en la ganancia de peso de corderos suplementados con una mezcla herbal (0, 0.1, 0.2 y 0.3 %) que contenía *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis*, estableciendo una dosis óptima del 0.14 % en la dieta. Dorantes-Iturbide *et al*. (2022), utilizando el mismo aditivo herbal, también reportaron una mejor conversión alimenticia y una mayor eficiencia en la utilización de la energía dietética; sin embargo, en ambos

estudios, no se evaluaron los cambios a nivel de la microbiota ruminal. No obstante, Tilahun *et al*. (2024) reportaron que en vacas lecheras, *Emblica officinalis* modificó la abundancia relativa de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en una respuesta a la dosis, y Jiang *et al*. (2021) reportaron que un extracto de raíz (*Glycyrrhiza uralensis*) en vacas favoreció la abundancia de *Bacteroidetes*. Los efectos antimetanogénicos de un aditivo herbal (*Zingiber officinale*, *Allium sativum*, *Artemisia vulgaris* y *Curcuma longa*) fueron evaluados por Rabee *et al*. (2024) quienes reportaron una reducción de las arqueas *Methanobrevibacter*. Se han evaluado otros aditivos poliherbales en codornices (1-2 % de materia seca), conejos (200-800 mg de mezcla poliherbal/kg de materia seca) y cerdos (hierbas antidiarreicas), y se han reportado efectos promotores del crecimiento, impactos económicos y salud intestinal (Cho *et al*., 2012; Jaurez-Espinosa *et al*., 2022; Jalal *et al*., 2024). Se ha informado que las plantas utilizadas como aditivo contienen flavonoides (Gantait *et al*., 2021), alcaloides (Krupanidhi *et al*., 2021), taninos (Jain *et al*., 2012), fenilpropanoides (Piras *et al*., 2018), polifenoles (Harun *et al*., 2025), terpenoides (Sharma *et al*., 2021) y glucósidos (Krupanidhi *et al*., 2021), que han demostrado propiedades antimetanogénicas (Sun *et al*., 2021; Kaur *et al*., 2023) asociadas con la reducción de arqueas y protozoos (Ornaghi *et al*. 2020; Lee-Rangel *et al*., 2022b) con efectos reflejados en el patrón de fermentación ruminal (Razo *et al*., 2020; Bhatt *et al*., 2021), metabolitos sanguíneos y aumento de peso (Lee-Rangel *et al*., 2022a; Martínez-Aispuro *et al*., 2022). Lo anterior permite establecer la hipótesis de que la inclusión del aditivo herbal en una dosis óptima reducirá la microbiota ruminal metanogénica, promoviendo la retención de energía y aumentando el rendimiento productivo en ovinos. En este sentido, los objetivos de esta investigación fueron determinar los metabolitos secundarios contenidos en un aditivo poliherbal a base de

Withania somnifera, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis*, y evaluar el efecto de incluir 0.14 % del herbal sobre el comportamiento productivo y la comunidad microbiana ruminal de corderos alimentados con una dieta de engorda.

MATERIALES Y METODOS

Caracterización del aditivo poliherbal

El aditivo poliherbal ImmuPlus® (Nuproxa México S. de R.L. de C.V., Indian Herbs), elaborado a partir de *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum, Tinospora cordifolia y Emblica officinalis*, se caracterizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS). Para extraer los compuestos bioactivos del aditivo poliherbal, se utilizó un procesador ultrasónico, adaptado con un agitador mecánico y una punta de titanio de 3 mm de diámetro (Cole-Parmer, IL). Se mezcló un gramo de muestra con hexano, utilizado como disolvente, y se procesó con un evaporador (Zymark TurboVap LV, NB, EE. UU.). Posteriormente, se inyectó en el sistema GC-MS (Hewlett Packard-Agilent 6890 GC Systems, CA), equipado con un capilar de columna de 60 m de longitud, 0.255 mm de diámetro y 0.25 µm de espesor (Hewlett Packard-Agilent 5MS, CA). El programa de temperatura, la temperatura del inyector, el caudal de helio y la programación de la espectrofotometría de masas los describe Roque-Jiménez *et al*. (2020).

Tratamientos y alimentación de corderos

El proyecto “Desempeño productivo y perfil metagenómico de la microbiota ruminal con un aditivo poliherbal en la dieta de corderos de engorda” fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación del Campus Universitario UAEM AMECAMECA con la referencia 02-2025.

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones experimentales de la Universidad

Autónoma del Estado de México (UAEM), ubicadas en Amecameca, Estado de México (98° 54′ 11″ O y 19° 27′ 38″ N, a una altitud de 2250 m).

Se utilizaron nueve corderos criollos (Suffolk × Dorper) con un peso corporal de 35.7 ± 2.6 kg. Se alojaron en corrales individuales equipados con comederos y bebederos con acceso *ad libitum* a agua fresca. Los corderos fueron asignados en un diseño completamente al azar a dos niveles de inclusión del poliherbal en una ración mixta total: 0.0% (cuatro corderos) y 0.14% (cinco corderos) de la materia seca en una ración experimental (59.93% grano de maíz, 22% rastrojo de maíz, 7% pasta de soya, 5% melaza de caña, 3% gluten de maíz, 1% urea y 1% premezcla mineral - Vitasal engorda ovino plus®) formulada de acuerdo a los Requerimientos Nutricionales para Pequeños Rumiantes (87.2% materia seca, 4.1% cenizas, 14.45% proteína cruda, 22% fibra detergente neutro, 12.6% fibra detergente ácido y 2.815 Mcal/kg) (NRC, 2007). Los corderos fueron alimentados dos veces al día y gradualmente se adaptaron a las dietas experimentales 10 días antes del inicio del experimento, y el consumo de alimento fue registrado diariamente por 15 días. Se registró el peso corporal individual los dos primeros días (peso inicial) y los dos últimos días del experimento (peso final). Para estimar la ganancia de peso diaria, se dividió el peso total ganado entre el número de días que duró la fase experimental. Este valor, junto con el consumo diario de materia seca, permitió estimar la conversión alimenticia. La retención de energía se estimó mediante una ecuación derivada del NRC (1985) para ovinos:

$$\boldsymbol{Energía\ retenida, Mcal/d} = \frac{\boldsymbol{Ganancia\ diaria\ de\ peso, Kg/d}}{\left(\mathbf{0.317} \times \left(\boldsymbol{Peso\ corporal\ ajustado, kg^{0.75}}\right)\right)}$$

La síntesis de proteína microbiana se estimó a partir de los ingredientes de la dieta, el

peso promedio de los animales y el consumo diario de alimento utilizando el Modelo de Proteína Metabolizable (Burroughs *et al*. 1974).

Toma de muestras y extracción de ADN

Después de 15 días de recibir las raciones experimentales, se recolecto líquido ruminal mediante una sonda esofágica en estado preprandial. Las muestras se filtraron a través de ocho capas de manta de cielo y se separaron en alícuotas de 1 mL, que se colocaron inmediatamente en hielo seco y se almacenaron en ultracongelación (-80 °C) hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN, se tomaron alícuotas de 250 µL de cada una de las muestras de líquido ruminal, y la extracción de ADN metagenómico se realizó utilizando el kit ZymoBIOMICS® (#cat. D4300, Zymo Research, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para mejorar la calidad del ADN extraído, se incluyó un paso adicional con Proteinasa K (concentración final de 100 mg/mL, a 55 °C, durante 60 min) después de la lisis mecánica (BeadBeater–96, Biospec Mini, OK). El ADN obtenido se cuantificó y analizó para determinar su calidad en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, MA). Las concentraciones de ADN metagenómico obtenidas oscilaron entre 64.7 ng/µL y 104.6 ng/µL. El ADN se envió a ZymoBIOMICS® (Zymo Research, CA) para su secuenciación.

Secuenciación parcial del gen ARNr 16S

Para diferenciar entre bacterias y arqueas, se realizó la secuenciación utilizando el kit de preparación de bibliotecas NGS Quick-16S™ (Zymo Research, CA). La región V3-V4 de este gen se amplificó con cebadores específicos diseñados por Zymo Research. La biblioteca de secuenciación se preparó mediante reacciones de PCR en tiempo real para controlar el número de ciclos y limitar la formación de quimeras. Los productos finales de la PCR se cuantificaron por fluorescencia y posteriormente se agruparon en

cantidades equimolares. La biblioteca agrupada final se limpió con Select a Size DNA Clean & Concentrator® (Zymo Research, CA) y posteriormente se cuantificó con TapeStation® (Agilent Technologies, CA) y Qubit® (Thermo Fisher Scientific, WA).

Como control positivo para la preparación de la biblioteca específica, se utilizó el estándar de ADN de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS® (Zymo Research, CA). La biblioteca final se secuenció en la plataforma Illumina® MiSeq™ (Illumina Inc., CA) con un kit de reactivos V3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con un 10% de adición de PhiX.

Análisis bioinformático

Se infirieron variantes únicas de la secuencia de amplicones (ASV) a partir de las secuencias sin procesar utilizando el Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2 (DADA2; Callahan *et al*., 2016), que también sirvió para eliminar secuencias quiméricas. La asignación taxonómica se realizó con Uclust by Qiime v.1.9.1 (Caporaso *et al*. 2010), utilizando una base de datos de Zymo como referencia. La visualización de la composición de la comunidad microbiana, así como los análisis de diversidad alfa y beta, también se realizaron utilizando Qiime. La riqueza y diversidad de la comunidad de los grupos testigo y herbal se analizaron mediante el estimador Chao1, así como los índices de Shannon (homogeneidad) y Simpson (diversidad), con 20,000 secuencias normalizadas. La diversidad beta se evaluó mediante un gráfico bidimensional de análisis de coordenadas principales (PCoA), creado a partir de la matriz de distancias pareadas entre muestras, calculada mediante la disimilitud de Bray-Curtis utilizando variantes únicas de secuencia de amplicones (ASV). A partir de la composición porcentual de la microbiota identificada y la síntesis de proteínas microbianas (g/d), se estimó la biomasa bacteriana evaluada en el rumen.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con SAS Studio (Cary, NC) y se comprobó su distribución normal (prueba de Shapiro-Wilk) mediante PROC UNIVARIATE NORMAL. Para el rendimiento animal y la energía retenida, se utilizó el peso vivo inicial de cada animal como covariable y se sometió a ANOVA - PROC GLM. Los resultados se presentan como medias de mínimos cuadrados. La abundancia relativa de las familias bacterianas y los datos de biomasa microbiana se normalizaron mediante la transformación log10 antes del análisis estadístico (Belanche *et al*., 2023). Se calculó una prueba de suma de rangos de Wilcoxon para los datos de las variables no normalizadas después de la transformación (Neves *et al*., 2017). Las medias con $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.1$ se consideraron efectos significativos y de tendencia, respectivamente. Los valores de p se ajustaron con el método de Benjamin-Hochberg (FDR - Tasa de Descubrimiento Falso) utilizando PROC MULTTEST. Las asociaciones entre las familias microbianas ruminales de interés biológico se evaluaron con los coeficientes de correlación de Pearson (PROC CORR).

RESULTADOS

Determinación del aditivo poliherbal

El análisis por cromatografía de gases del poliherbal mostró la presencia de 61 compuestos, entre los que destacan un monoterpeno fenólico (timol), un fenilpropanoide (eugenol), un ácido graso monoinsaturado (ácido oleico), un benzaldehído (vainillina), un sesquiterpenoide (óxido de criofileno), un alqueno (2,3,3-trimetil-1-penteno), un lípido prenólico (olopenona), un cinamaldehído (4-dimetoxi cinamaldehído) y un aldehído graso (tetradecanal) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Composición química por GC - MS del aditivo poliherbal formulado con *Withania somnifera*, *Ocimum tenuiflorum*, *Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis*

Compuesto	Tiempo de retención	% Área
Timol	15.207	0.580
Eugenol	16.586	0.590
Ácido Cis-9-Octadecenoico	17.147	0.770
Vanillin	17.582	0.240
Oxido de cariofileno	21.078	0.530
2,3,3-Trimetil-1-penteno	22.096	0.460
Olopenona	23.281	0.450
3,4-Dimetoxi cinamaldehido	23.756	0.450
Tetradecanal	24.660	0.470

Comportamiento productivo

A nivel productivo, el aditivo herbal no promovió el consumo de alimento (P = 0.249), a pesar de que la cantidad de materia seca requerida para ganar un kg de peso se redujo en un 19.67 % (P = 0.039), como resultado de una tendencia a ganar más peso (34.68 % vs. testigo; P = 0.065) y energía retenida (34.53 % vs. testigo; P = 0.064) (Cuadro 2). Este comportamiento se reflejó en borregos más pesados (P = 0.065, Cuadro 2) al final del período experimental con la suplementación del herbal.

Cuadro 2. LS-Means de comportamiento productivo y energía retenida en corderos alimentados con una dieta rica en grano y suplementados con un poliherbal[a]

	Poliherbal[a], %			
	0	**0.14**	**EEM**	**Valor P**
Peso final, kg	39.60	40.92	0.800	0.065
Consumo de materia seca, g/d	1492.4	1611.2	49.413	0.249
Ganancia diaria de peso, g	190.98	257.21	17.542	0.065
Conversión alimenticia	7.97	6.41	0.477	0.039
Energía retenida, Mcal/d	0.917	1.252	0.082	0.064

[a]Elaborado con: *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia*, *Ocimum sanctum* and *Emblica officinalis*. EEM: Error Estándar de la Media.

Procesamiento de secuencias

A partir de la secuenciación parcial del gen ARNr 16S (V3-V4), se obtuvieron un total de 958,454 secuencias sin procesar (un promedio de 106,495 secuencias por muestra). Tras realizar un filtrado de calidad, así como la detección y eliminación de quimeras (25,595 secuencias), el total de secuencias analizadas fue de 412,272 con un rango de 31,914 a 61,456 secuencias por muestra.

Análisis de Diversidad Alfa y Beta

En el análisis de diversidad alfa (Cuadro 3), si bien existe una ligera diferencia en los valores de los índices, no se observa una diferencia significativa en la comunidad microbiana ruminal entre las muestras tratadas con el poliherbal y el testigo.

Cuadro 3. Diversidad alfa de las comunidades microbianas en el rumen de corderos alimentados con una dieta rica en grano y suplementados con un poliherbal[a]

	Testigo	Poliherbal[a]	EEM	Valor de p
Chao 1	238.00	212.80	17.163	0.502
Shannon	5.96	5.73	0.142	0.462
Simpson	25.22	23.06	2.592	0.707

[a]Elaborado con: *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia*, *Ocimum sanctum* and *Emblica officinalis*. EEM: Error Estándar de la Media.

El gráfico de análisis de coordenadas principales (PCoA) de diversidad beta (Figura 1) permite agrupar las muestras según la disimilitud de Bray-Curtis en su composición, utilizando variantes únicas de secuencias de amplicones (ASV) para crear la matriz de distancia por pares. Cada punto del gráfico representa un perfil completo de composición microbiana. Las muestras con perfiles de composición microbiana similares están más próximas entre sí, mientras que las muestras con perfiles diferentes están más alejadas. Existe una notable disimilitud entre las comunidades microbianas presentes en las muestras del grupo testigo, como lo indica la mayor distancia entre ellas. Por el contrario, las muestras del tratamiento poliherbal parecen más similares entre sí, lo que indica que sus perfiles de composición microbiana son comparables. Fue posible separar las muestras en dos grupos: testigo y herbal, lo que indica que el aditivo herbal probado tiene el potencial de modificar la composición y la estructura de las comunidades microbianas ruminales en corderos.

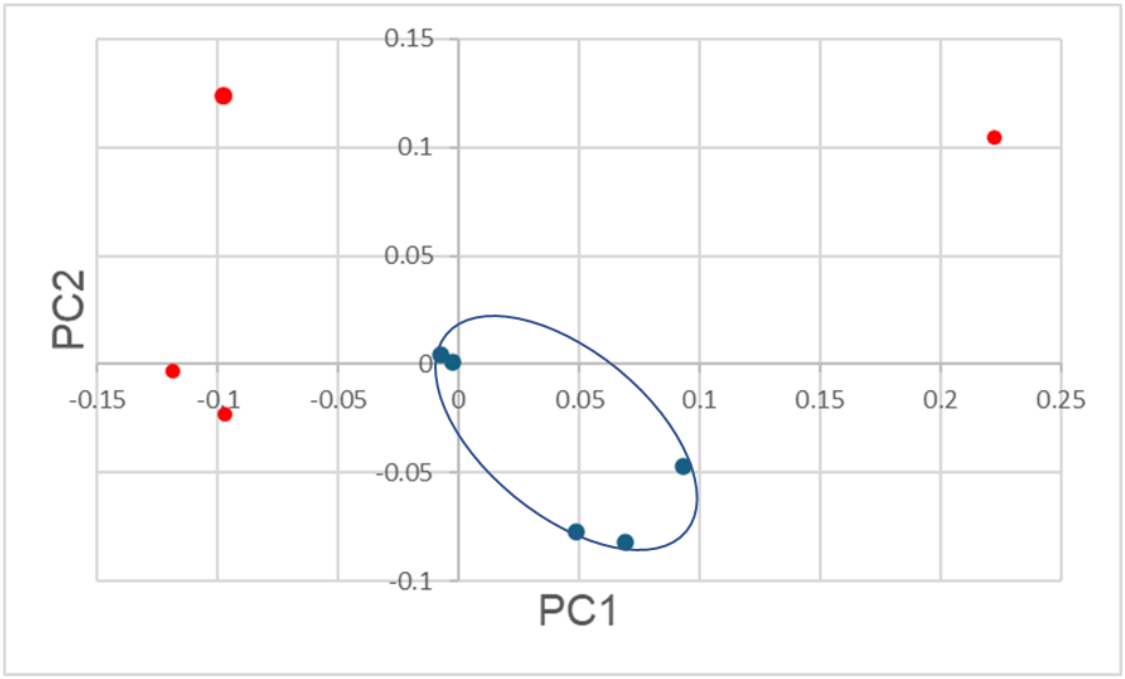

Figura 1. Análisis de diversidad beta (PCoA). Los puntos rojos representan muestras del testigo (inclusión del poliherbal 0%) y los azules, muestras de corderos alimentados con poliherbal (inclusión 0.14%); el grupo de elipses azules representa muestras similares correspondientes a un nivel de inclusión del 0.14%.

Análisis metagenómico

El análisis de la microbiota ruminal no mostró diferencias significativas en los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Cuadro 4), a pesar de reducciones del 25.97 % (P = 0.300) y aumentos del 20.24 % (P = 0.159) en comparación con el testigo, respectivamente. La relación *Bacteroidetes:Firmicutes* se redujo con el tratamiento herbal, pero con un valor p = 0.327. Los efectos del poliherbal en la abundancia relativa de las familias microbianas se muestran en el Cuadro 5. Se observaron reducciones en *Methanobacteriaceae* (P = 0.048; 72.8%), Clostridiales de la familia XIII (P = 0.098; 60%) y *Ruminococcaceae* (P = 0.098; 70.5%).

Cuadro 4. Diferencias entre *Bacteroidetes* y *Firmicutes* en el rumen de corderos alimentados con una dieta rica en concentrado y suplementados con un poliherbal[a]

	Testigo	**Poliherbal[a]**	**EEM**	**Valor de p**
Bacteroidetes, %	23.62	28.40	2.151	0.159
Firmicutes, %	50.90	37.68	4.542	0.300
Bacteroidetes:Firmicutes	2.57	1.35	0.403	0.327

[a]Elaborado con: *Withania somnifera*, *Tinospora cordifolia*, *Ocimum sanctum* and *Emblica officinalis*. EEM: Error Estándar de la Media.

A nivel de biomasa bacteriana (Cuadro 6), el poliherbal tendió a reducir, en comparación con el grupo testigo, a *Methanobacteriaceae* (P = 0.098; 72.7%) y Clostridiales Familia XIII_Incertae_Sedis (P = 0.098; 60.03%).

Cuadro 5. Efecto de la inclusión de un poliherbal en la abundancia relativa de familias bacterianas en corderos alimentados con una dieta rica en concentrado

		Poliherbal (%)			
Familia / Clase		**0**	**0.14**	**EEM**	**Valor P**
Methanobacteriaceae	%	1.250	0.340	0.208	0.098
Bifidobacteriaceae	%	1.350	0.640	0.528	0.578
Coriobacteriaceae	%	2.850	1.320	0.521	0.497
Bacteroidaceae	%	0.200	0.180	0.063	0.925
Bacteroidales	%	3.700	2.660	0.552	0.537
Prevotellaceae	%	19.125	24.940	2.313	0.497
Rikenellaceae	%	0.400	0.500	0.047	0.537
Christensenellaceae	%	0.475	0.040	0.128	0.525
Eubacteriaceae	%	0.150	0.080	0.063	0.578
Clostridiales*	%	0.350	0.140	0.047	0.098
Lachnospiraceae	%	18.650	15.840	1.636	0.847
Ruminococcaceae	%	13.875	4.080	2.355	0.098
Erysipelotrichaceae	%	10.700	10.260	3.442	0.787
Acidaminococcaceae	%	1.600	1.140	0.324	0.880
Veillonellaceae	%	4.950	6.080	0.595	0.537
Succinivibrionaceae	%	18.075	30.300	3.782	0.525
Mollicutes	%	0.375	0.200	0.066	0.497

EEM: Error Estándar de la Media; * Familia XIII_Incertae_Sedis

Table 6. Efecto de la inclusión de un poliherbal en la biomasa microbiana sintetizada en corderos alimentados con una dieta rica en concentrado

		Poliherbal (%)			
Familia/ Clase		**0**	**0.14**	**EEM**	**Valor P**
Methanobacteriaceae	g/d	0.964	0.263	0.161	0.098
Bifidobacteriaceae	g/d	1.041	0.494	0.407	0.901
Coriobacteriaceae	g/d	2.198	1.018	0.401	0.502
Bacteroidaceae	g/d	0.154	0.139	0.049	0.901
Bacteroidales	g/d	2.853	2.051	0.426	0.546
Prevotellaceae	g/d	14.746	19.229	1.784	0.502
Rikenellaceae	g/d	0.309	0.386	0.037	0.546
Christensenellaceae	g/d	0.366	0.031	0.099	0.467
Eubacteriaceae	g/d	0.116	0.062	0.049	0.849
Clostridiales*	g/d	0.270	0.108	0.036	0.098
Lachnospiraceae	g/d	14.379	12.213	1.262	0.839
Ruminococcaceae	g/d	10.698	3.146	1.816	0.333
Erysipelotrichaceae	g/d	8.250	7.911	2.654	0.814
Acidaminococcaceae	g/d	1.234	0.879	0.250	0.849
Veillonellaceae	g/d	3.816	4.688	0.459	0.546
Desulfovibrionaceae	g/d	0.251	0.169	0.031	0.502
Succinivibrionaceae	g/d	13.936	23.361	2.916	0.502
Mollicutes	g/d	0.289	0.154	0.051	0.502

EEM: Error Estándar de la Media; * Familia XIII_Incertae_Sedis

Se observó una correlación negativa entre *Methanobacteriaceae* y *Succinivibrionaceae* (R = -0.73; P = 0.024) y *Prevotellaceae* (R = -0.72; P = 0.029). Estos cambios podrían tener un impacto biológico en el metabolismo del hidrógeno en el rumen. *Methanobacteriaceae* presenta una correlación positiva con *Coriobacteriaceae* (R = 0.94, P = 0.0002), Clostridiales Familia XIII_Incertae_Sedis (R = 0.83, P = 0.0057), *Acidaminococcaceae* (R = 0.77, P = 0.014) y Mollicutes (R = 0.70, P = 0.034).

DISCUSIÓN

Para ser considerados promotores del crecimiento, los aditivos herbales deben aumentar la ganancia de peso, mejorar la eficiencia alimenticia y disminuir la incidencia de enfermedades en los animales (Kuralkar y Kuralkar, 2021). Las propiedades de los productos herbales dependen de los metabolitos secundarios producidos por las plantas, como aceites esenciales, terpenoides, polifenoles, taninos, alcaloides y flavonoides, entre otros (Daniel *et al*., 2024). En los rumiantes, su rendimiento productivo depende de un ecosistema microbiano y de su capacidad enzimática para digerir carbohidratos estructurales y otros sustratos que aportan ácidos grasos volátiles, proteína microbiana y vitaminas del complejo B (Krehbiel, 2014). Además, los aditivos herbales aumentan las secreciones digestivas y la absorción de nutrientes, lo que promueve una utilización eficiente del alimento (Ivanova *et al*., 2024).

La energía es el principal elemento dietético responsable de la asimilación de nutrientes, la productividad y la ganancia de peso (Sayed, 2009). Las mayores ganancias de peso en corderos suplementados con el producto herbal y sus fitoquímicos se explican por una mejor capacidad para retener energía dentro del cuerpo en forma de proteínas y grasas (Garrett *et al*., 1959). Por ejemplo, el timol

mejoró el metabolismo energético hepático al mejorar el estado antioxidante hepático en peces (Morselli *et al*., 2020). En conejos, el eugenol mejora el rendimiento del crecimiento y reduce la respuesta inflamatoria (Alrashedi *et al*., 2024), lo cual es crucial para mantener el equilibrio energético (Wang y Ye, 2015). Además, el cariofileno participa en la mejora del metabolismo de la glucosa en las células del músculo esquelético (Geddo *et al*., 2021). En corderos, Orzuna-Orzuna *et al*. (2024) evaluaron otro aditivo poliherbal rico en ácidos grasos de cadena larga, carvacrol, y otros fitoquímicos. Se reportó un aumento en la producción de energía metabolizable como resultado de una mayor eficiencia en la actividad enzimática a nivel de la cadena de transporte de electrones, lo cual se relaciona con una mayor capacidad respiratoria en las mitocondrias (Pecorelli *et al*., 2013). Kolath *et al*. (2006) establecen que una mayor tasa de respiración mitocondrial se asocia con una mayor eficiencia alimentaria, energía retenida y ganancia de peso.

En rumiantes, la energía retenida también depende de la eficiencia ruminal, que define el flujo de proteína dietética y microbiana, así como la absorción de energía a través del epitelio ruminal y el tracto posterior (Ørskov, 1982). La capacidad de absorción de nutrientes en esta región proporciona al animal sustratos listos para ser metabolizados. En este sentido, el rumen actúa como reservorio de microorganismos que facilita la fermentación del alimento ingerido (Arévalo-Turrubiarte y Roca-Fernández, 2025), sirviendo como nexo entre la dieta y la productividad animal al aportar energía en forma de ácidos grasos volátiles (Gleason y White, 2018). Aunque en este estudio no se midieron las concentraciones de ácidos grasos volátiles, los compuestos fitoquímicos del aditivo poliherbal podrían influir en el patrón de fermentación mediante modificaciones del microbioma ruminal (Li *et al*., 2022; Rabee *et al*., 2024).

La familia *Ruminococcaceae*, una bacteria *Firmicutes* gramnegativa que fue reducida por el aditivo poliherbal, se asocia con la actividad fibrolítica y celulolítica, así como con la producción de ácido acético. Schären *et al*. (2017) informaron que inhibir el crecimiento de bacterias grampositivas, como las de la familia *Ruminococcaceae*, en el rumen puede aumentar potencialmente la concentración de propionato. El ácido oleico, un compuesto bioactivo detectado en el poliherbal, inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias fibrolíticas debido a su naturaleza insaturada, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y la lisis celular, interrumpiendo la cadena de transporte de electrones y desacoplando la fosforilación oxidativa, inhibiendo así las actividades enzimáticas de la membrana y la absorción de nutrientes (Enjalbert *et al*., 2017; Yoon *et al*., 2018).

El eugenol, también detectado en el poliherbal, es un compuesto fenólico con actividad antibiótica (Calsamiglia *et al*., 2007) que podría mejorar la utilización de energía al disminuir ($P \leq 0.1$) la relación acético:propiónico (A/P) (Castillejos *et al*., 2006; Yang *et al*., 2010). Este aceite esencial, junto con el timol y la vainillina, tienen el potencial de afectar la actividad de las bacterias grampositivas y gramnegativas (Cobellis *et al*., 2016).

Un rendimiento estable del proceso de digestión anaeróbica se asocia positivamente con las poblaciones de *Firmicutes* en lugar de las de *Bacteroidetes* (Briones *et al*., 2014). Por lo tanto, la disminución de la población de *Firmicutes* podría atribuirse a una disminución de los grupos bacterianos que degradan la fibra y producen hidrógeno, lo cual podría estar relacionado con la reducción de las emisiones de metano. Otro género perteneciente al filo *Firmicutes* es *Clostridium*, que produce isoformas de glicosidasas, enzimas involucradas en la degradación de la celulosa

(Rubino *et al*., 2017) y la pared celular vegetal (Yan *et al*., 2022). La reducción en los diferentes grupos bacterianos que degradan la fibra debería afectar la relación *Firmicutes*:*Bacteroidetes*, pero estadísticamente, el aditivo herbal no la modificó. La abundancia relativa de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* representa la relación competitiva entre ambos filos y el rendimiento del proceso de digestión anaeróbica (Enjalbert *et al*., 2017; Faniyi *et al*., 2019). Factores como el tamaño del efecto, el tamaño de la muestra y la dispersión de los datos podrían influir en el valor de p (Dahiru, 2008). Incluso si *Firmicutes* se reduce con el aditivo poliherbal, el número de réplicas por grupo y la variabilidad probablemente podrían afectar la sensibilidad estadística (Dahiru, 2008).

Una disminución en la diversidad bacteriana facilita el establecimiento de especies bacterianas específicas y su predominio en el ecosistema ruminal (Li *et al*., 2022). En este estudio, la diversidad alfa fue similar ($P > 0.10$) entre los grupos experimentales; sin embargo, la diversidad beta mostró una disminución con el aditivo poliherbal, lo cual podría estar relacionado con el contenido de metabolitos secundarios (Li *et al*., 2022). La diversidad alfa se utiliza para estimar la diversidad de la comunidad microbiana en muestras individuales (Zheng *et al*., 2022). Hassan *et al*. (2021) explican que la falta de efectos significativos en la diversidad alfa podría estar relacionada con la corta duración de la suplementación alimenticia y la capacidad de los microorganismos ruminales para adaptarse y descomponer los fitoquímicos proporcionados por el poliherbal. Por el contrario, el efecto del poliherbal en la diversidad beta sugiere diferencias en el desarrollo del rumen y de grupos clave de microorganismos al evaluar la complejidad de las especies en muestras a nivel de grupo.

Otros compuestos detectados en el poliherbal son el β-cariofileno, el tetradecanal, la oplopenona y el 3,4-dimetoxi cinamaldehído. El β-cariofileno exhibe una fuerte actividad antimicrobiana y bacteriostática, que puede modular la función ruminal (Cobellis *et al*., 2016; Poulopoulou y Hadjigeorgiou, 2021). El tetradecanal ha demostrado una alta especificidad contra bacterias grampositivas, ya que previene la síntesis de peptidoglicano en sus paredes celulares (Mora-Vivas *et al*., 2016). La olopenona es un compuesto común en *Chamaecyparis lawsoniana* y posee propiedades antibacterianas y antifúngicas (Palá-Paúl *et al*., 2012), y el 3,4-dimetoxi cinamaldehído que pertenece a la clase de los cinamaldehídos. Busquet *et al*. (2006) informaron que el cinamaldehído tiene potencial antimicrobiano contra bacterias grampositivas dañinas, y en comparación con otros compuestos poliherbales, puede ingresar al periplasma y otras partes internas de la célula a través de la membrana que atraviesa las porinas.

La digestión anaeróbica es un proceso microbiano llevado a cabo por una comunidad microbiana compleja, en donde uno de los productos finales es el metano (Chen *et al*., 2016). El contenido de fitoquímicos como eugenol, timol, 3,4-dimetoxi cinamaldehído, β-cariofileno, o la interacción entre ellos, puede causar una disminución en la producción de metano al disminuir la abundancia relativa de arqueas o bacterias metanogénicas que tienen hidrógeno como producto metabólico (Wang *et al*., 2023). También se ha observado un efecto similar en arqueas metanogénicas con timol, otro compuesto detectado en el aditivo poliherbal analizado, que se acumula en la doble capa lipídica de la membrana celular de algunos géneros de la familia *Methanobacteriaceae*, causando cambios morfológicos que impiden la formación de ATP por la pérdida de iones y, por lo tanto, causan un crecimiento lento o la muerte

celular (Engel *et al*., 2017; Al-Dabisi *et al*., 2023).

La capacidad antimicrobiana de los compuestos presentes en los aceites esenciales varía considerablemente en función de su composición química, la configuración química de sus componentes y las interacciones entre ellos (Burt, 2004). Cobellis *et al*. (2016) descubrieron que una mezcla de aceites esenciales compuesta de cinamaldehído, eugenol y otros compuestos redujo la abundancia de arqueas metanogénicas. Aiman-Zakaria *et al*. (2017), utilizando un extracto de hoja de palma con compuestos fenólicos y flavonoides, mostraron una disminución en la abundancia de arqueas metanogénicas.

En el presente estudio, el poliherbal redujo la abundancia de la familia *Methanobacteriaceae* en un 72.8% en comparación con el grupo testigo. Este resultado es alto en comparación con Rabee *et al*. (2024) y Jafari *et al*. (2018), quienes suplementaron cabras con un aditivo poliherbal y hojas de *Carica papaya*, respectivamente, y reportaron reducciones en la abundancia relativa de metanógenos del 2.33% para el poliherbal y entre el 6% y el 10% para las hojas de papaya, o con Szulc *et al*. (2020), quienes en condiciones *in vitro* reportaron una reducción en arqueas del 17.76% con el uso de aditivos herbales ($P<0.01$).

Se detectó una correlación negativa entre *Methanobacteriaceae, Succinivibrionaceae* y la familia *Prevotellaceae*. La familia *Succinivibrionaceae* se ha encontrado en mayores cantidades en el rumen con dietas ricas en granos (Petri *et al*., 2014). Las arqueas metanogénicas y la familia *Succinivibrionaceae* compiten por el uso de hidrógeno como intermediario energético. La reducción en el uso de H_2 por parte de las arqueas proporciona energía a los rumiantes, ya que *Succinivibrionaceae* puede utilizar H_2 para formar propionato (Shabat *et al*., 2016).

La alta producción de ácido propiónico provoca una reducción en la síntesis de metano. La otra familia, *Prevotellaceae*, se ha asociado con una baja producción de metano y una alta producción de propionato (Shinkai *et al*., 2024) al secuestrar hidrógeno a través de las vías del succinato o del acrilato, respectivamente, durante la fermentación de azúcares o lactato (Purushe *et al*., 2010). Este hallazgo concuerda con el de Shinkai *et al*. (2024), quienes informaron que *Prevotellaceae*, *Succinivibrionaceae* y *Lachnospiraceae* se asocian con bajas emisiones de metano en rumiantes. Aunque Krause *et al*. (2003) destacaron el papel de *Lachnospiraceae* en la degradación de celulosa y la fermentación de carbohidratos estructurales. En este estudio, esta familia no se modificó con la inclusión del aditivo herbal.

La correlación positiva entre la familia *Methanobacteriaceae* y las familias *Coriobacteriaceae* y *Acidaminococcaceae* indica una estrecha relación entre estas bacterias, ya que están relacionadas con la producción de acetato (Koike *et al*., 2021) y butirato (D'Auria *et al*., 2011), respectivamente. Las arqueas son principalmente metanógenas hidrogenotróficas, y estas, a su vez, dirigen la fermentación hacia la formación de acetato (Patra *et al*., 2017), mientras que el ácido butírico se asocia con la producción de metano (D'Auria *et al*., 2011). En cuanto al orden Clostridiales, sus miembros son bacterias lignocelulolíticas y polisacarolíticas dominantes que contribuyen a la producción de AGV (Xing *et al*., 2020). En el caso de Mollicutes, se trata de una clase de micoplasmas ruminales con capacidad fermentativa (filum grampositivo *Firmicutes*), que pertenece a un consorcio bacteriano que utiliza pectina para producir metano (Joblin y Naylor, 2002; Stülke *et al*., 2009).

En este trabajo no se evaluaron los protozoos ruminales; sin embargo, se ha documentado que el timol, contenido en el poliherbal, causa una disminución de su

cantidad y, por lo tanto, de la de arqueas, dada su relación simbiótica (Ku-Vera *et al*., 2020; Al-Dabisi *et al*., 2023). Además, los resultados de este estudio proporcionan evidencia de cómo los aditivos herbales podrían reducir las emisiones de metano, ofreciendo una solución sostenible en la producción de rumiantes (Ahmed *et al*., 2024).

CONCLUSIONES

En corderos, el aditivo poliherbal con *Withania somnifera, Ocimum tenuiflorum, Tinospora cordifolia* y *Emblica officinalis* redujo las arqueas productoras de metano y moduló las bacterias metabolizadoras de hidrógeno, lo que mejoró el rendimiento animal.

Las implicaciones biológicas del aditivo poliherbal podrían posicionarlo como un potencial promotor del crecimiento en la producción intensiva de rumiantes con un enfoque sostenible centrado en la reducción de las emisiones de gases de efecto invernadero.

REFERENCIAS

Ahmed, M.G., Elwakeel, E.A., El-Zarkouny, S.Z., Al-Sagheer, A.A. 2024. Environmental impact of phytobiotic additives on greenhouse gas emission reduction, rumen fermentation manipulation, and performance in ruminants: an updated review. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 31(26):37943-37962.

Aiman-Zakaria, A., Yong-Meng, G., Ali-Rajion, M., Jafari, S., Faseleh-Jahromi, M., Shokriyazdan, P., Ebrahimi, M. 2017. The influence of plant polyphenols from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) leaf extract on fermentation characteristics, biohydrogenation of C18 PUFA, and microbial populations in rumen of goats: *in vitro* study. Acta Agric. Scand. A — Anim. Scie. 67(1-2):76-84.

Al-Dabisi, A.N., Al-Galbi, H.A., Al-Hellou, M.F. 2023. The effect of adding thymol on rumen fermentations, the digestibility of nutrients and bacterial count of Arabi lamb's rumen fluid *in vitro*. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 1262(7):072078.

Alrashedi, S.S., Almasmoum, H.A., Eldiasty, J.G. 2024. The effect of dietary eugenol nano-emulsion supplementation on growth performance, serum metabolites, redox homeostasis, immunity, and pro-inflammatory responses of growing rabbits under heat stress. Open Vet. J. 14(3):830-839.

Arévalo-Turrubiarte, M., Roca-Fernández, A.I. 2025. Recent Research on Livestock Microbiota, Its Role in Digestion and Its Impact on Methane Emissions. Ruminants 5(2):25.

Belanche, A., Palma-Hidalgo, J.M., Jiménez, E., Yáñez-Ruiz, D.R. 2023. Enhancing rumen microbial diversity and its impact on energy and protein metabolism in forage-fed goats. Front. Vet. Sci. 10:2023.

Bhatt, R.S., Sarkar, S., Sahoo, A., Sharma, P., Soni, L., Saxena, V.K., Soni, A. 2021. Dietary inclusion of mature lemon grass and curry leaves affects nutrient utilization, methane reduction and meat quality in finisher lambs. Anim. Feed Sci. Technol. 278:114979.

Briones, A., Coats, E., Brinkman, C. 2014. Should We Build "Obese" or "Lean" Anaerobic Digesters? PLOS ONE. 9(5):e97252.

Burroughs, W., Trenkle, A., Vetter, R.L. 1974. A system of protein evaluation for cattle and sheep involving metabolizable protein (amino acids) and urea fermentation potential of feedstuffs. Vet. Med. Small Anim. Clin. 69(6):713-719.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. Int. J. Food Microbiol. 94(3):223-253.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 89(2):761-771.

Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., Dada, S.H. 2016. High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods. 13:581-583.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90(6):2580-2595.

Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez, P.A., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone C.A., McDonald, D., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A. Widmann, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods. 7(5):335-336.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. J. Dairy Sci. 89(7):2649-2658.

Chen, S., Cheng, H., Wyckoff, K.N., He, Q. 2016. Linkages of Firmicutes and Bacteroidetes populations to methanogenic process performance. J. Ind. Microbiol. Biotech. 43(6):771-781.

Cheng, M., McCarl, B., Fei, C. 2022. Climate change and livestock production: a literature review. Atmosphere. 13(1):140.

Cho, J.H., Zhang, S., Kim, I.H. 2012. Effects of anti-diarrhoeal herbs on growth performance, nutrient digestibility, and meat quality in pigs. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 25(11):1595-1604.

Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Sci. Total Environ. 545-546:556-568.

D'Auria, G., Galán, J.C., Rodríguez-Alcayna, M., Moya, A., Baquero, F., Latorre, A. 2011. Complete genome sequence of *Acidaminococcus intestini* RYC-MR95, a Gram-negative bacterium from the phylum *Firmicutes*. J. Bacteriol. 193(24):7008-7009.

Dahiru, T. 2008. P – value, a true test of statistical significance? A cautionary note. Ann. Ib. Postgrad. Med. 6(1):21-26.

Daniel, I.K., Njue, O.M., Sanad, Y.M. 2024. Antimicrobial effects of plant-based supplements on gut microbial diversity in small ruminants. Pathogens. 13(1):31.

Dorantes-Iturbide, G., Orzuna-Orzuna, J.F., Lara-Bueno, A., Miranda-Romero, L.A., Mendoza-Martínez, G.D., Hernández-García, P.A. 2022. Effects of a polyherbal dietary additive on performance, dietary energetics, carcass traits, and blood metabolites of finishing lambs. Metabolites. 12(5):413.

Engel, J.B., Heckler, C., Tondo, E.C., Daroit, D.J., da Silva-Malheiros, P. 2017. Antimicrobial activity of free and liposome-encapsulated thymol and carvacrol against Salmonella and *Staphylococcus aureus* adhered to stainless steel. Int. J. Food Microbiol. 252:18-23.

Enjalbert, F., Combes, S., Zened, A., Meynadier, A. 2017. Rumen microbiota and dietary fat: a mutual shaping. J. Appl. Microbiol. 123(4):782-797.

Faniyi, T.O., Adegbeye, M.J., Elghandour, M.M.M.Y., Pilego, A.B., Salem, A.Z.M., Olaniyi, T.A., Adediran, O., Adewumi, M.K. 2019. Role of diverse fermentative

factors towards microbial community shift in ruminants. J. Appl. Microbiol. 127(1):2-11.

FAOSTAT. 2020. Cambio climático: emisiones de los sistemas agroalimentarios. https://www.fao.org/statistics/es

Gantait, S., Mahanta, M., Bera, S., Verma, S.K. 2021. Advances in biotechnology of *Emblica officinalis* Gaertn. syn. *Phyllanthus emblica* L.: a nutraceuticals-rich fruit tree with multifaceted ethnomedicinal uses. 3 Biotech. 11(2):62.

Garrett, W.N., Meyer, J., Lofgreen, G. 1959. The comparative energy requirements of sheep and cattle for maintenance and gain. J. Anim. Sci. 18(2):528-547.

Geddo, F., Antoniotti, S., Querio, G., Salaroglio, I.C., Costamagna, C., Riganti, C., Gallo, M.P. 2021. Plant-derived trans-β-caryophyllene boosts glucose metabolism and ATP synthesis in skeletal muscle cells through cannabinoid type 2 receptor stimulation. Nutrients. 13(3):916.

Gleason, C.B., White, R.R. 2018. Variation in animal performance explained by the rumen microbiome or by diet composition. J. Anim. Sci. 96(11):4658-4673.

Harun, N.L.A., Mohd, Y.H., Samsudin, A.A., Sazili, A.Q., Goh, Y.M. 2025. Effect of polyphenol supplementation on milk composition and fatty acid of dairy animal: a systematic review. Ruminants. 5(2):15.

Hassan, F., Tang, Z., Ebeid, H.M., Li, M., Peng, K., Liang, X., Yang, C. 2021. Consequences of herbal mixture supplementation on milk performance, ruminal fermentation, and bacterial diversity in water buffaloes. PeerJ. 9:e11241.

Ivanova, S., Sukhikh, S., Popov, A., Shishko, O., Nikonov, I., Kapitonova, E., Krol, O., Larina, V., Noskova, S., Babich, O. 2024. Medicinal plants: A source of phytobiotics for the feed additives. J. Agric. Food Res. 16:101172.

Jafari, S., Goh, Y.M., Rajion, M.A., Ebrahimi, M., Jahromi, M.F. 2018. Dietary supplementation with papaya (*Carica papaya* L.) leaf affects abundance of rumen methanogens, fermentation characteristics and blood plasma fatty acid composition in goats. Span. J. Agric. Res. 16(2):e0607.

Jain, R., Kachhwaha, S., Kothari, S. 2012. Phytochemistry, pharmacology, and biotechnology of *Withania somnifera* and *Withania coagulans*: A review. J. Med. Plants Res. 6(41):5388-5399.

Jalal, H., Doğan, S.C., Giammarco, M., Cavallini, D., Lanzoni, L., Pezzi, P., Akram, M.Z., Fusaro, I. 2024. Evaluation of dietary supplementation of garlic powder (*Allium sativum*) on the growth performance, carcass traits and meat quality of Japanese quails (*Coturnix coturnix* japonica). Poult. Sci. 103(12):104231.

Jaurez-Espinosa, M., Hernández-García, P.A., Osorio-Terán, A.I., Mendoza-Martínez, G.D., Ojeda-Carrasco, J.J., Tapia-Rodríguez, M.Z., Espinosa-Ayala, E. 2022. Impacto económico y productivo de una mezcla herbal con derivados de colina en la producción de conejos. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 13(1):82-96.

Jiang, C., Ding, L., Dong, Q., Wang, X., Wei, H., Hu, C., Ma, C., Yan, Q., Zhou, Y., Degen, A.A. 2021. Effects of root extracts of three traditional Chinese herbs as dietary supplements on dry matter intake, average daily gain, rumen fermentation and ruminal microbiota in early weaned yak calves. Anim. Feed Sci. Technol. 278:115002.

Joblin, K.N., and Naylor, G.E. 2002. The ruminal mycoplasmas: a review. J. Appl. Anim. Res. 21(2):161-179.

Kaur, H., Kaur, G., Gupta, T., Mittal, D., Ali, S.A. 2023. Integrating omics technologies for a comprehensive understanding of the microbiome and its impact on cattle production. Biology. 12(9):1200.

Khairunisa, B.H., Heryakusuma, C., Ike, K., Mukhopadhyay, B., Susanti, D. 2023. Evolving understanding of rumen methanogen ecophysiology. Front. Microbiol. 14: 1296008.

Koike, S., Ueno, M., Miura, H., Saegusa, A., Inouchi, K., Inabu, Y., Sugino, T., Guan, L.L., Oba, M., Kobayashi, Y. 2021. Rumen microbiota and its relation to fermentation in lactose-fed calves. J. Dairy Sci. 104(10):10744-10752.

Kolath, W.H., Kerley, M.S., Golden, J.W., Keisler, D.H. 2006. The relationship between mitochondrial function and residual feed intake in Angus steers. J. Anim. Sci. 84(4):861-865.

Krehbiel, C.R. 2014. Applied nutrition of ruminants: Fermentation and digestive physiology. Prof. Anim. Sci. 30(2):129-139.

Krupanidhi, S., Abraham, P.K, Venkateswarulu, T.C., Ayyagari, V.S., Nazneen, B.M, John, B.D., Venkata, N.A., Aishwarya, G. 2021. Screening of phytochemical compounds of *Tinospora cordifolia* for their inhibitory activity on SARS-CoV-2: an *in silico* study. J. Biomol. Struct. Dyn. 39(15):5799-5803.

Ku-Vera, J.C., Jiménez-Ocampo, R., Valencia-Salazar, S.S., Montoya-Flores, M.D., Molina-Botero, I.C., Arango, J., Gómez-Bravo, C.A., Aguilar-Pérez, C.F., Solorio-Sánchez, F.J. 2020. Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. Front. Vet. Sci. 7:584.

Kuralkar, P., Kuralkar, S.V. 2021. Role of herbal products in animal production – An updated review. J. Ethnopharmacol. 278:114246.

Lee-Rangel, H.A., Mendoza-Martinez, G.D., Martínez-García, J.A., Espinosa-Ayala, E., Hernández-García, P.A., Cifuentes-López, R.O., Vazquez-Valladolid, A., García-López, J.C., Lara-Bueno, A., Roque-Jiménez, J.A. 2022a. An Indian polyherbal phytogenic source improved blood serum biochemistry and immune response of dairy calves. Food Agric. Immunol. 33(1):97-112.

Lee-Rangel, H.A., Roque-Jiménez, J.A., Cifuentes-López, R.O., Álvarez-Fuentes, G., Cruz-Gómez, A.D.l., Martínez-García, J.A., Arévalo-Villalobos, J.I., Chay-Canul, A.J. 2022b. Evaluation of three marine algae on degradability, *in vitro* gas production, and CH_4 and CO_2 emissions by ruminants. Fermentation. 8(10):511.

Li, M., Hassan, F., Peng, L., Xie, H., Liang, X., Huang, J., Huang, F., Guo, Y., Yang, C. 2022. Mulberry flavonoids modulate rumen bacteria to alter fermentation kinetics in water buffalo. PeerJ. 10:e14309.

Martínez-Aispuro, J.A., Ayala-Monter, M.A., Mendoza-Martínez, G.D., Sánchez-Torres, M.T., Cordero-Mora, J.L., Figueroa-Velasco, J.L., Martínez-Cruz, I. 2022. Evaluation of herbal choline in productive performance and blood metabolites of ewes. Agro Prod. 15(9):109-116.

Mendoza-Martínez, G., Plata-Pérez, F.X., Espinosa-Cervantes, R., Lara-Bueno, A. 2008. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. Univ. Cienc. 24(1):75-87.

Mora-Vivas, F.D., Velasco, J., Díaz, T., Rojas-Fermín, L., Díaz, T.L, Ríos-Tesch, N., Carmona, J. 2016. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Peperomia acuminata* de los Andes venezolanos. Rev. Peru. Biol. 23:301-304.

Morselli, M.B., Reis, J.H., Baldissera, M.D., Souza, C.F., Baldisserotto, B., Petrolli, T.G., Paiano, D., Lopes, D.L.A., Da Silva, A.S. 2020. Benefits of thymol supplementation on performance, the hepatic antioxidant system, and energetic metabolism in grass carp. Fish Physiol. Biochem. 46(1):305-314.

Neves. A.L.A., Li, F., Ghoshal, B., McAllister, T., Guan, L.L. 2017. Enhancing the Resolution of rumen microbial classification from metatranscriptomic data using kraken and mothur. Front. Microbiol. 8:2445.

NRC, National Research Council. 1985. Nutrient requirements of sheep. Vol. 5. Washington, DC; The National Academies Press.

NRC, National Research Council. 2007. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, DC; The National Academies Press.

Ornaghi, M., Prado, R.M., Ramos, T.R., Catalano, F.R., Mottin, C., Creevey, C.J., Huws, S.A., Prado, I.N. 2020. Natural plant-based additives can improve ruminant performance by influencing the rumen microbiome. Res. Sq. 1:1-22.

Ørskov, E.R. 1982. Protein nutrition in ruminants. Chicago: Academic Press.

Orzuna-Orzuna, J.F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Mendoza-Martínez, G.D., Miranda-Romero, L.A., Hernández-García, P.A. 2021. Growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites of lambs supplemented with a polyherbal mixture. Animals. 11(4):955.

Orzuna-Orzuna, J.F., Lara-Bueno, A., Gloria-Trujillo, A., Mendoza-Martínez, G.D., Miranda-Romero, L.A., Hernández-García, P.A. 2024. Growth performance, dietary energetics, blood metabolites, carcass traits, meat quality, and gene

expression of lambs supplemented with a polyherbal phytogenic additive. Vet. Sci. 11:520.

Palá-Paúl, J., Usano-Alemany, J., Granda, E., Soria, A.C. 2012. Antifungal and antibacterial activity of the essential oil of *Chamaecyparis lawsoniana* from Spain. Nat. Prod. Commun. 7(10):1383-1386.

Patra, A.K. 2014. Trends and projected estimates of ghg emissions from indian livestock in comparisons with GHG emissions from world and developing countries. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 27(4):592-599.

Pecorelli, A., Leoni, G,, Cervellati, F., Canali, R., Signorini, C., Leoncini, S., Cortelazzo, A., De Felice, C., Ciccoli, L., Hayek, J., Valacchi, G. 2013. Genes related to mitochondrial functions, protein degradation, and chromatin folding are differentially expressed in lymphomonocytes of rett syndrome patients. Mediators Inflamm. 2013(1):137629.

Petri, R.M., Schwaiger, T., Penner, G.B., Beauchemin, K.A., Forster, R.J., McKinnon, J.J., McAllister, T.A. 2014. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. PLoS ONE. 8(12):e83424.

Pinares-Patiño, C.S., Hickey, S.M., Young, E.A., Dodds, K.G., MacLean, S., Molano, G., Sandoval, E., Kjestrup, H., Harland, R., Hunt, C. Pickering, N.K., McEwan, J.C. 2013. Heritability estimates of methane emissions from sheep. Animal. 7(Suppl 2):316-321.

Piras, A., Gonçalves, M.J., Alves, J., Falconieri, D., Porcedda, S., Maxia, A., Salgueiro, L. 2018. *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of *Lamiaceae* family with bioactive essential oils. Ind. Crops Prod. 113:89-97.

Poulopoulou, I., Hadjigeorgiou, I. 2021. Evaluation of Terpenes' degradation rates by rumen fluid of adapted and non-adapted animals. Nat. Prod. Bioprospect. 11(3):307-313.

Purushe, J., Fouts, D.E., Morrison, M., White, B.A., Mackie, R.I., North American Consortium for Rumen, Coutinho PM, Henrissat B, Nelson KE. 2010. Comparative genome analysis of *Prevotella ruminicola* and Prevotella bryantii: insights into their environmental niche. Microb. Ecol. 60(4):721-729.

Rabee, A.E., Mohamed, M. Ghandour, M., Sallam, A., Elwakeel, E.A., Mohammed, R.S., Sabra, E.A., Abdel-Wahed, A.M., Mourad, D.M., Hamed, A.A., Hafez, O.R. 2024. Rumen fermentation and microbiota in Shami goats fed on condensed tannins or herbal mixture. BMC Vet. Res. 20(1):35.

Razo-Ortíz, P.B., Mendoza-Martínez, G.D., Silva-Vázquez, G., Osorio-Teran, A.I., González-Sánchez, J.F., Hernández-García, P.A., de la Torre-Hérnandez, M.E., Espinosa-Ayala, E. 2020. Polyherbal feed additive for lambs: effects on performance, blood biochemistry and biometry. J. Appl. Anim. Res. 48(1):419-424.

Roque-Jiménez, J.A., Mendoza-Martínez, G.D., Vázquez-Valladolid, A., Guerrero-González, M., Flores-Ramírez, R., Pinos-Rodriguez, J.M., Loor, J.J., Relling, A.E., Lee-Rangel, H.A. 2020. Supplemental herbal choline increases 5-hmc dna on whole blood from pregnant ewes and offspring. Animals. 10(8):1277.

Rubino, F., Carberry, C., Waters, S.M., Kenny, D., McCabe, M.S., Creevey, C.J. 2017. Divergent functional isoforms drive niche specialisation for nutrient acquisition and use in rumen microbiome. ISME J. 11(4):932-944.

Sayed, A.B.N. 2009. Effect of different dietary energy levels on the performance and nutrient digestibility of lambs. Vet. World. 2(11):418-420.

Schären, M., Drong, C., Kiri, K., Riede, S., Gardener, M., Meyer, U., Hummel, J., Urich, T., Breves, G., Dänicke, S. 2017. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. J. Dairy Sci. 100(4):2765-2783.

Shabat, S.K.B., Sasson, G., Doron-Faigenboim, A., Durman, T., Yaacoby, S., Berg Miller, M.E., White, B.A., Shterzer, N., Mizrahi, I. 2016. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. ISME J. 10(12):2958-2972.

Sharma, H., Rao, P.S., Singh, A.K. 2021. Fifty years of research on *Tinospora cordifolia*: From botanical plant to functional ingredient in foods. Trends Food Sci. Technol. 118:189-206.

Shinkai, T., Takizawa, S., Enishi, O., Higuchi, K., Ohmori, H., Mitsumori, M. 2024. Characteristics of rumen microbiota and Prevotella isolates found in high propionate and low methane-producing dairy cows. Front. Microbiol. 15:140499.

Stülke, J., Eilers, H., Schmidl, S.R. 2009. Mycoplasma and Spiroplasma. In: Schaechter M, editor. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Oxford: Academic Press; p. 208-219.

Sun. K., Liu, H., Fan, H., Liu, T., Zheng, C. 2021. Research progress on the application of feed additives in ruminal methane emission reduction: a review. PeerJ. 9:e11151.

Szulc, P., Mravčáková, D., Szumacher-Strabel, M., Váradyová, Z., Várady, M., Čobanová, K., Syahrulawal, L., Patra, A.K., Cieslak, A. 2020. Ruminal

fermentation, microbial population and lipid metabolism in gastrointestinal nematode-infected lambs fed a diet supplemented with herbal mixtures. PLoS ONE. 15(4):e0231516.

Tilahun, M., Ma, L., Callaway, T.R., Xu, J., Bu, D. 2024. The effect of *Phyllanthus emblica* (Amla) fruit supplementation on the rumen microbiota and its correlation with rumen fermentation in dairy cows. Front. Microbiol. 15:1365681.

Wang, H., Ye, J. 2015. Regulation of energy balance by inflammation: Common theme in physiology and pathology. Rev. Endocr. Metab. Disord. 16(1):47-54.

Wang, W., Wang, Y., Guo, T., Gao, C., Yang, Y., Yang, L., Cui, Z., Mao, J., Liu, N., An, X., Qi, J. 2023. Blend of Cinnamaldehyde, Eugenol, and *Capsicum oleoresin* improved rumen health of lambs fed high-concentrate diet as revealed by fermentation characteristics, epithelial gene expression, and bacterial community. Animals. 13(10):1663.

Xing, B.S., Han, Y., Wang, X.C., Wen, J., Cao, S., Zhang, K., Li, Q., Yuan, H. 2020. Persistent action of cow rumen microorganisms in enhancing biodegradation of wheat straw by rumen fermentation. Sci. Total Environ. 715:136529.

Yan, L., Tang, L., Zhou, Z., Lu, W., Wang, B., Sun, Z., Jiang, X., Hu, D., Li, J., Zhang, D. 2022. Metagenomics reveals contrasting energy utilization efficiencies of captive and wild camels (*Camelus ferus*). Integr. Zool. 17(3):333-345.

Yang, W.Z,. Benchaar, C., Ametaj, B.N., Beauchemin, K.A. 2010. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. Anim. Feed Sci. Technol. 158(1):57-64.

Yoon, B.K., Jackman, J.A., Valle-González, E.R., Cho, N.J. 2018. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. Int. J. Mol. Sci. 19(4):1114.

Zheng, J., Liang, S., Zhang, Y., Sun, X., Li, Y., Diao, J., Dong, L., Ni, H., Yin, Y., Ren, J., Yang, Y., Zhang, Y. 2022. Effects of compound chinese herbal medicine additive on growth performance and gut microbiota diversity of Zi goose. Animals. 12(21):2942.

CAPITULO 2.

EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO, EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO Y EL PERFIL DE FERMENTACIÓN EN EL GANADO BOVINO DE CARNE: UN METAANÁLISIS

RESUMEN

Las emisiones de metano ruminal contribuyen al calentamiento global y a la pérdida de energía en el ganado bovino. El uso de plantas ricas en metabolitos secundarios para mitigar las emisiones de metano se ha estudiado ampliamente, con resultados dispares. El objetivo principal de este metaanálisis fue evaluar el impacto de los metabolitos secundarios en la producción de metano, el rendimiento productivo y la fermentación ruminal en ganado bovino de carne al que se le administraron suplementos de origen vegetal. De acuerdo con las directrices PRISMA, se seleccionaron para el análisis 43 de los 578 estudios, empleando modelos de efectos aleatorios para estimar las diferencias medias brutas y estandarizadas (RStudio: metafor y ggplot, con umbrales de significación de $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.1$). La heterogeneidad se evaluó mediante la estadística I^2, junto con una metarregresión por subgrupos en la que se examinaron variables como la dosis, el tipo de aditivo, la forma del aditivo y la relación entre forraje y concentrado. Tras la prueba de Egger y el análisis «trim and fill», se observó que los taninos reducían la producción de metano (g/kg de materia seca, SMD ajustada = -0.463), aumentaban la producción de propionato (%, RMD = 0.066, p = 0.001), el pH ruminal (SMD ajustada = 0.307) y la ingesta de materia orgánica (RMD = 0.066; p = 0.01). A pesar de que los compuestos fenólicos, los flavonoides, los terpenos y los terpenoides modularon con éxito la

producción de metano, los parámetros fermentativos y la ingesta de nutrientes, el reducido número de comparaciones y el sesgo de publicación sugieren que hay que actuar con cautela a la hora de generalizar estos resultados. En conclusión, la administración de suplementos con aditivos de origen vegetal que contienen taninos ofrece una estrategia nutricional prometedora para reducir las emisiones de metano entérico sin mermar el comportamiento productivo del ganado bovino de carne.

Palabras clave: efecto antimetanogénico; compuestos fenólicos; herbales; metano entérico; rumiantes

ABSTRACT

Rumen methane emissions contribute to global warming and energy loss in cattle. The use of plants rich in secondary metabolites to mitigate methane emissions has been extensively studied, with varying outcomes. The primary aim of this meta-analysis was to assess the impact of secondary metabolites on methane production, productive performance, and ruminal fermentation in beef cattle supplemented with plant-based additives. In accordance with the PRISMA guidelines, 43 of the 578 studies were selected for analysis, employing random-effects models to estimate the raw and standardized mean differences (RStudio: metafor and ggplot, with significance thresholds of $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.1$). Heterogeneity was evaluated using the I^2 statistic, alongside a subgroup meta-regression examining variables such as the dose, additive type, additive form, and forage-to-concentrate ratio. After Egger test and trim and fill analysis, tannins reduced methane yield (g/kg DM, adjusted SDM= -0.463), increased propionate production (%, RMD=0.066, p=0.001), rumen pH (adjusted SMD=0.307), and organic matter intake (RMD=0.066, p=0.01). Despite phenolic compounds, flavonoids, terpenes, and terpenoids successfully modulating methane production, fermentative parameters, and nutrient intake, the small number of comparisons and publication bias suggest caution in generalizing these results. In conclusion, supplementation with plant-based additives containing tannins offers a promising nutritional strategy for reducing enteric methane emissions while maintaining beef cattle performance.

Keywords: antimethanogenic effect; phenolic compounds; herbs; enteric methane; ruminants.

INTRODUCCIÓN

La producción de ganado bovino desempeña un papel económico y social crucial a nivel mundial; sin embargo, también se asocia a un impacto medioambiental significativo (Phesatcha *et al*., 2022). El metano (CH_4), un subproducto de la fermentación microbiana ruminal, es uno de los principales gases de efecto invernadero que contribuyen al calentamiento global (Króliczewska *et al*., 2023). Además, las emisiones de metano representan una pérdida de energía de la dieta, estimada entre el 3 % y el 10 % (Sirohi *et al*., 2003), que, de otro modo, podría contribuir al crecimiento y a la eficiencia metabólica del animal. Por lo tanto, las estrategias destinadas a reducir las emisiones de metano no solo abordan las preocupaciones medioambientales, sino que también pueden mejorar la eficiencia en la utilización de nutrientes (Bharanidharan *et al*., 2024). En los últimos años, numerosas investigaciones se han centrado en identificar intervenciones nutricionales eficaces para mitigar las emisiones entéricas de metano sin afectar negativamente a la productividad de los animales (Aboagye *et al*., 2019).

Entre las posibles estrategias de mitigación, los aditivos de origen vegetal han ido ganando cada vez más atención debido a su amplia disponibilidad, aceptación y versatilidad en diversos sistemas de producción animal (Hassan *et al*., 2020; Kholif y Olafadehan, 2021). Estos aditivos son fuentes de metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas. El uso de técnicas analíticas avanzadas ha facilitado la identificación y caracterización de estos compuestos, lo que ha permitido establecer una correlación entre estructuras químicas específicas y vías biosintéticas con sus distintos efectos biológicos (Kabera *et al*., 2014). Anteriormente, los metabolitos secundarios se consideraban tóxicos y antinutricionales para los animales; sin

embargo, se ha demostrado que influyen en la ecología del rumen al modular las interacciones microbianas y las vías de fermentación, en particular aquellas que afectan a la utilización del hidrógeno y a la actividad metanogénica (Ku- Vera *et al*., 2020). Estos cambios pueden alterar la producción de CH_4, los perfiles de fermentación y la utilización de nutrientes (Ku-Vera *et al*., 2020; Sirohi *et al*., 2009).

En concreto, se ha demostrado que los productos de origen vegetal enriquecidos con terpenoides, taninos, saponinas y flavonoides tienen efectos sobre las emisiones de metano y sobre los parámetros relacionados con la salud ruminal y la productividad (Ebrahim y Negussie, 2020). Por ejemplo, se ha demostrado que las leguminosas como la *Leucaena leucocephala*, utilizadas como fuentes de taninos, reducen el metano cuando se incluyen en un 30-35 % de la materia seca, mientras que las saponinas y los terpenoides han demostrado su eficacia a través de su impacto en la estructura de la comunidad microbiana y el metabolismo de las arqueas, con reducciones de metano de hasta un 26 % (Ku-Vera *et al*., 2020). Sin embargo, la respuesta a la suplementación se ve influida por el tipo específico de metabolito (Jayanegara *et al*., 2010), la fuente vegetal (Kamra *et al*., 2012), la composición de la dieta basal y el contexto del sistema de producción (Espinoza-Velasco y Mella, 2021). En consecuencia, los compuestos clasificados dentro del mismo grupo químico pueden provocar efectos variables entre los distintos estudios, lo que contribuye a la variabilidad observada en la literatura. La magnitud de estos efectos puede depender además de factores como la duración del experimento, la metodología de medición del metano y la diversidad química dentro de cada categoría de metabolito (Aboagye *et al*., 2019; Ebrahim y Negussie, 2020: Kabera *et al*., 2014).

Por lo tanto, el objetivo de este metaanálisis fue evaluar los efectos de los metabolitos

secundarios, administrados como aditivos de origen vegetal, sobre las emisiones de metano, el rendimiento productivo y los parámetros de fermentación ruminal en el ganado bovino de carne.

MATERIALES Y MÉTODOS

Búsqueda bibliográfica y criterios de selección

Este metaanálisis se llevó a cabo de acuerdo con las directrices «Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses» (PRISMA) (Figura 1) [14]. Para evaluar los efectos de los metabolitos secundarios de origen vegetal sobre las emisiones de metano, el rendimiento productivo y la fermentación ruminal en el ganado bovino de carne, se llevó a cabo una búsqueda sistemática en las bases de datos PubMed, Web of Science, Scopus, CAB Abstracts y ScienceDirect. La última búsqueda bibliográfica se realizó el 1 de diciembre de 2025. La estrategia de búsqueda se formuló utilizando los términos de Población, Intervención, Comparación y Resultado (PICO): ("steers" OR "beef cattle" OR "cattle" OR "calf" OR "beef") AND ("terpenoids" OR "essential oils" OR "alkaloids" OR "phenolic compounds" OR "flavonoids" OR "tannins" OR "glycosides" OR "saponins") AND ("methane" OR "methane production" OR "CH_4") AND ("*in vivo*"). Las cadenas de búsqueda completas se encuentran en el Material Sumplementario 1. Los términos de búsqueda se adaptaron a cada base de datos y se aplicaron los filtros adecuados según fuera necesario. La clasificación de los metabolitos secundarios se basó en los marcos establecidos por Kabera *et al*. (2014) y Li *et al*. (2023). Aunque los flavonoides y los taninos pertenecen al amplio grupo de los compuestos fenólicos, en este análisis se consideraron categorías separadas debido a sus diferencias estructurales. Los flavonoides son una subclase de polifenoles caracterizada por una estructura básica C6-C3-C6 compuesta por dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres átomos de carbono. Los taninos también pertenecen al grupo de los polifenoles, pero constituyen una clase distinta dentro de los compuestos fenólicos no flavonoides y, por lo tanto, se clasifican por

separado. Dado que los polifenoles abarcan una amplia variedad de compuestos con diferentes características químicas, la clasificación separada de los flavonoides y los taninos permitió distinguir grupos con estructuras específicas dentro de la categoría general de los compuestos fenólicos (Kabera *et al*., 2014).

Se incluyeron los estudios *in vivo* con ganado bovino destinados al consumo si evaluaban la incorporación en la dieta de metabolitos secundarios (entre ellos, terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, glucósidos y saponinas) a través de aditivos de origen vegetal, y si informaban de al menos una de las siguientes variables: producción de metano, rendimiento productivo o perfil de fermentación ruminal. Los estudios considerados debían haber proporcionado datos suficientes para estimar el tamaño del efecto, incluyendo la media, la medida de dispersión y el número de réplicas. Se excluyeron las revisiones, los metaanálisis y los estudios *in vitro*, así como los artículos relacionados con especies ajenas al ámbito de interés (por ejemplo, seres humanos, roedores, etc.) y aquellos que no contenían las variables a utilizar (Herremans *et al*., 2020).

La búsqueda bibliográfica, la selección de títulos y resúmenes, y la evaluación del texto completo de los artículos fueron realizadas de forma independiente por tres investigadores (K. M. V.-A., U. R. C.-M. y A. G.-T.) de acuerdo con los criterios de elegibilidad descritos anteriormente. Todos los registros recuperados de las bases de datos se importaron a EndNote™ 20.6 (Build 17174) para la gestión de referencias, la eliminación de duplicados y la selección. Cualquier desacuerdo durante la selección de títulos y resúmenes o la evaluación del texto completo se resolvió por consenso. Las decisiones finales sobre la elegibilidad fueron revisadas y validadas por dos autores (M.E.T.-H y P.A.H.-G).

Una vez seleccionados los 43 estudios definitivos, dos investigadores (K.M.V.-A. y U.R.C.-M.) llevaron a cabo la extracción de datos de forma independiente utilizando una hoja de cálculo de Microsoft Excel. A. G.-T. verificó los datos extraídos y cualquier discrepancia se resolvió de forma conjunta. Todos los datos se extrajeron de las tablas, los textos o las figuras disponibles.

Extracción de datos

Dos autores, trabajando conjuntamente, extrajeron los siguientes datos de cada estudio: tamaño de la muestra (n), medias, desviación estándar (DE) o error estándar de la media (EEM), tipo de metabolito secundario, forma del aditivo (extracto, hoja o aceite), la dosis de inclusión expresada en gramos por kilogramo de materia seca (cuando los estudios empleaban porcentajes de materia seca o miligramos por kilogramo de materia seca como unidades de medida, se realizaron las conversiones pertinentes) y las características de la dieta (incluida la relación forraje-concentrado cuando se indicaba explícitamente). En los casos en los que no se facilitaba la DE y sí se documentaba el EEM, la DE se calculó de la siguiente manera: $DE = EEM \times \sqrt{n}$ (Orzuna-Orzuna *et al*., 2021).

Cuando un estudio informaba de múltiples tratamientos, cada comparación con el grupo testigo se consideró una unidad independiente para mantener la coherencia durante la extracción de datos.

Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo en RStudio Desktop (versión 2026.01.0-392) utilizando los paquetes metafor y ggplot (Viechtbauer, 2010). La composición nutricional de las dietas se caracterizó mediante estadística descriptiva, incluyendo la media, el mínimo, el máximo, la desviación estándar y el coeficiente de variación. Se

utilizaron modelos de efectos aleatorios para comparar los grupos testigo y tratamiento. Se utilizaron dos medidas para calcular el tamaño del efecto: la diferencia media bruta (RMD) con interpretación biológica de las unidades originales de cada variable y calculada como la diferencia directa entre las medias del grupo de tratamiento y del grupo testigo, y la diferencia media estandarizada (SMD, para comparaciones entre estudios con diferentes escalas o unidades), calculada mediante el método de Hedges (1981), que se aplicó cuando existían diferencias de escala o de unidades entre los estudios (Lin y Aloe, 2021).

Sesgo de publicación y "trim all fill"

El sesgo de publicación se evaluó mediante la revisión visual del gráfico de embudo y se cuantificó utilizando la prueba de Egger (1997). Un gráfico de embudo simétrico sugiere la ausencia de sesgo de publicación, mientras que la asimetría puede indicar un posible sesgo. Un valor $p \leq 0.01$ en la prueba de Egger indica asimétrico en el gráfico de embudo y que existe un posible sesgo de publicación. Se realizaron análisis de sensibilidad posteriores para garantizar la fiabilidad de los resultados del metaanálisis, y se aplicó el procedimiento no paramétrico «trim and fill» de Tweedie para determinar si se requerían estudios adicionales generados aleatoriamente para reducir el posible sesgo de publicación (Duval y Tweedie, 2000; Liu *et al*., 2026).

Meta-regresión

Para investigar las posibles fuentes de heterogeneidad, se realizaron meta-regresiones utilizando el método empleado por DerSimonian y Larid (1986), teniendo en cuenta los moderadores seleccionados a priori en función de su plausibilidad biológica, relevancia nutricional y disponibilidad en la base de datos extraída. Los moderadores evaluados fueron la dosis del metabolito secundario o aditivo, expresada

en g/kg de materia seca, para explorar posibles respuestas dependientes del nivel de inclusión; el tipo de aditivo o metabolito secundario, definido por la clase y subclase del compuesto suplementado; la forma del aditivo, incluyendo extracto, hoja, aceite, cáscara, flor, semilla, o corteza, ya que estas formas pueden diferir en la disponibilidad y la concentración relativa de los compuestos bioactivos; y la proporción de forraje, por ejemplo, 100:0, 95:5 u 80:20, debido a su influencia en el entorno ruminal, el perfil de fermentación y la respuesta de los metabolitos secundarios en raciones con diferentes proporciones de forraje. Los resultados presentados incluían el coeficiente del moderador (QM), el valor de p, el residuo τ^2 y el porcentaje de heterogeneidad explicado (R^2). Las variables sometidas a meta-regresión fueron aquellas que presentaban una heterogeneidad sustancial ($I^2 > 60$ %) (Salami *et al*., 2020), y se llevó a cabo una meta-regresión adicional para estimar el coeficiente ß, que define la dirección y la magnitud de la interacción entre cada variable de respuesta y los moderadores específicos (Viechtbauer, 2010). El objetivo de este estudio fue esclarecer mejor la relación entre los metabolitos secundarios de origen vegetal y la forma y la fuente del aditivo.

RESULTADOS

Búsqueda de información

Se identificaron un total de 578 registros en las bases de datos, de los cuales 43 se incluyeron en la revisión narrativa (Figura 1). Tras eliminar los duplicados, se excluyó el 20.42 % (n = 118) y se conservó el 79.58 % (n = 460) para la selección. Durante el proceso de selección de títulos, se excluyeron 323 registros (el 55.88 % del total), lo que dejó 137 artículos para la evaluación de los resúmenes (el 23.70 % del total). Posteriormente, se excluyeron 86 resúmenes (el 14.88 % del total) por no cumplir los

criterios de evaluación, y se revisaron íntegramente 51 artículos (el 8.82 % del total). Se recuperaron todos los textos completos (n = 51) para su revisión. Durante la revisión de los textos completos, se excluyeron ocho estudios (el 1.38 % del total) porque no presentaban datos sobre mediciones de metano ni sobre rendimiento productivo. Finalmente, el 7.44 % del total de los estudios se incluyó en la síntesis narrativa (Figura 1).

Los documentos provinieron de estudios realizados entre 2018 y 2024 en diversos países repartidos en tres continentes: América, Asia y Oceanía. Brasil representó el 30.2 % de los estudios, mientras que Argentina y Perú, en conjunto, solo representaron el 4.6 %. El origen geográfico de todos los estudios incluidos se presenta en la Tabla 1. Del número total de animales examinados, el 37.2 % eran de la especie *Bos indicus*, seguidos de animales criollos (34.8 %). Además, el 13.9 % de los estudios se centró en animales de la especie *Bos taurus*, el 6.9 % en búfalos y el 6.9 % restante en ganado de raza no especificada. En cuanto a las dosis administradas, se observó una variabilidad considerable entre los estudios, así como en los métodos de administración, siendo los extractos el 39.5 %, las hojas el 25.58 % y los aceites el 11.6 % del total de artículos (Tabla 1).

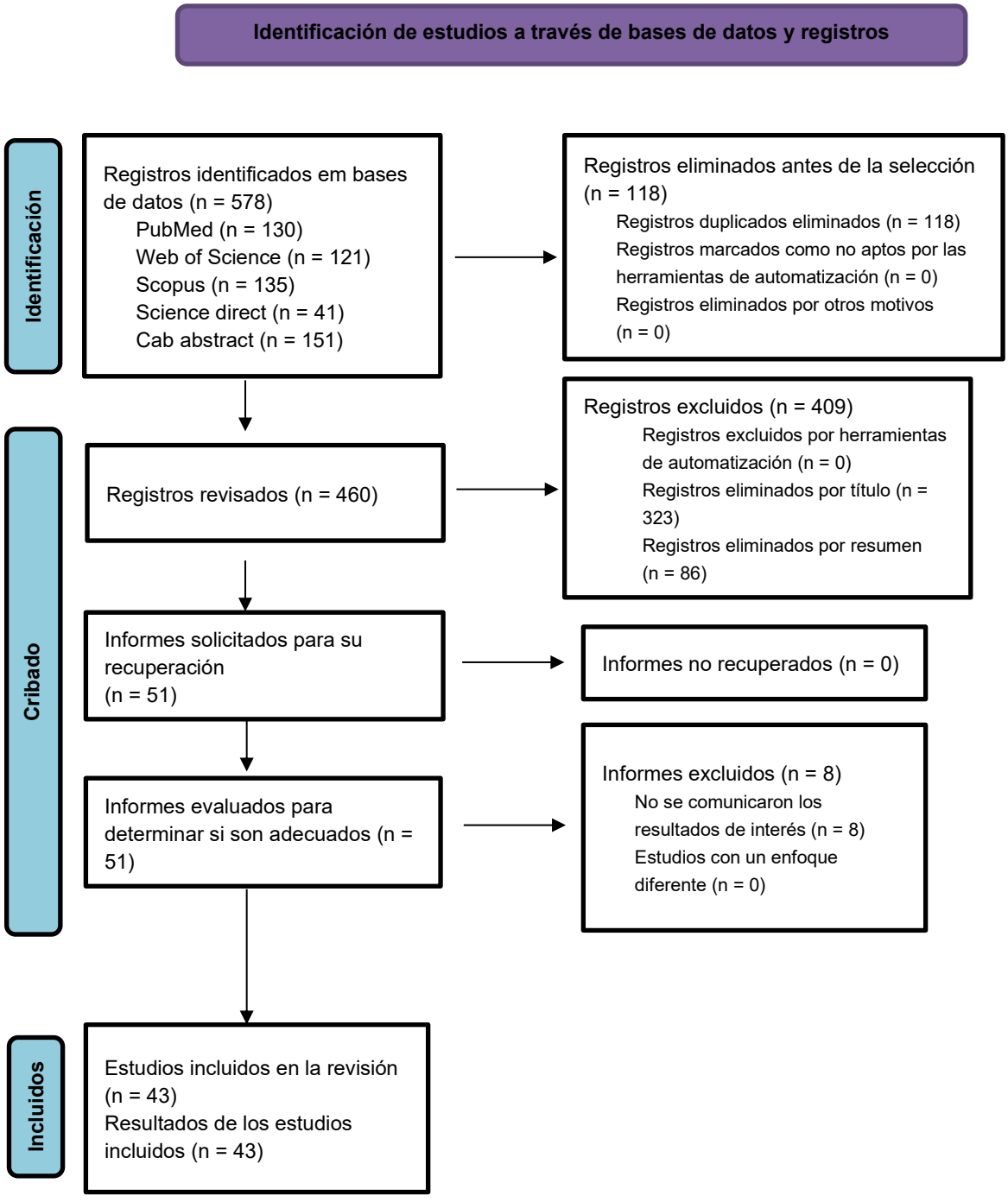

Figure 1. PRISMA flowchart for meta-analysis

Cuadro 1. Descripción de los artículos utilizados en la revisión narrativa para identificar metabolitos empleados en la alimentación de ganado de carne

Autor	Metabolito secundario	Planta (Nombre cientifico)	Presentación del aditivo	Dosis	País	Raza
Aboagye *et al*. (2018)	Taninos	*Castanea spp* y *Lysiloma divaricatum*	Extracto	2.5, 15 g/kg MS	Canada	Cruza
Aboagye *et al*. (2019)	Taninos	*Castanea spp*	Extracto	15, 15, 20 g/kg MS	Canada	Cruza
Alecrim *et al*. (2024)	Taninos	*Lotus uliginosus Lotus angustissimus*	Hoja	4, 12 g/kg MS	Uruguay	Hereford
Alemu *et al*. (2019)	Terpenoides	Carvacrol*	Aceite	0.15 g/kg MS	Canada	Cruza
Ampapon *et al*. (2019)	Taninos y saponinas	*Garcinia mangostana*, *Musa paradisiaca* L.	Cáscara, flor	167, 113, 145 g/kg MS	Tailandia	Búfalo
Ampapon y Wanapat (2020)	Taninos y saponinas	*Nephelium lappaceum*	Cáscara	20, 40, 60 g/kg MS	Tailandia	Brahman × Nativa Tailandesa
Benetel *et al*. (2024)	Compuestos fenólicos	*Origanum vulgare*	Aceite	3 ml/kg MS	Brasil	Nellore
Bharanidharan *et al*. (2024)	Flavonoides	*Ipomoea nil* L.	Semilla	50 g/kg MS	Corea del Sur	Hanwoo
Bitsie *et al*. (2022)	Flavonoides	*Allium sativum* y *Citrus aurantium*	Extracto	2.5 g/kg MS	Estados Unidos	Angus × Simmental
Caetano *et al*. (2019)	Taninos	*Vitis vinifera* L.	Residuo solido	31.2 g/kg MS	Australia	Angus
Cidrini *et al*. (2022)	Taninos	*Schinopsis lorentzii* y *Castanea spp*	Extracto	7 g/kg MS	Brasil	Nellore
Coneglian *et al*. (2019)	Terpenos	*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*	Aceite	1, 2, 4, 8 g/kg MS	Brasil	Nellore
Cuervo *et al*. (2024)	Taninos y saponinas	*Anacardium occidentale*	Extracto	0.4 g/kg MS	Estados Unidos	Cruza de angus
de Sa Assis e*t al*. (2023)	Taninos	*Anadenanthera macrocarpa*, *Mimosa tenuiflora*, *Prosopis juliflora*	Extracto	10, 10, 10 g/kg MS	Brasil	Nellore
Fagundes *et al*., 2020	Taninos	*Acacia mimosa*	Extracto	12.5, 25 g/kg MS	Brasil	Nellore
Fonseca *et al*. (2024)	Taninos	*Arachis hypogaea*, *Sorghum spp*., *Glycine*	Cáscara, grano, cáscara	950, 950, 950 g/kg MS	Brasil	Nellore

		max				
González *et al*. (2025)	Taninos	*Lotus tenuis*	Hoja	0.21, 0.48 g/kg MS	Argentina	Angus
Jiménez-Ocampo *et al*. (2022)	Monoterpenos	*Citrus sinensis* L.	Aceite	2.5, 5.0 g/kg MS	México	*Bos indicus* × *Bos taurus*
Khejornsart *et al*. (2024)	Taninos	*Piper sarmentosum*, *Cymbopogon citratus*, *Anacardium occidentale* L., *Careya arborea Roxb*	Hoja	1.66, 1.63, 1.67, 1.66 g/kg MS	Tailandia	Nativa Tailandesa × Brahman × Charolais
Koenig *et al*. (2018)	Taninos	*Acacia mearnsii*	Extracto	25 g/kg MS	Canada	Novillas
Kumari *et al*. (2019)	Taninos y saponinas	*Trigonella foenum-graecum* L.	Semilla	120.04 g/kg MS	India	Murrah Búfalo
Magnani *et al*. (2023)	Taninos	*Castanea s*pp y *Lysiloma divaricatum*	Extracto	0.7 g/kg MS	Brasil	Nellore
Mezzomo *et al*. (2018)	Taninos	*Castanea spp* and *Lysiloma divaricatum*	Extracto	25 g/kg MS	Brasil	Nellore
Molina-Botero *et al*. (2019)	Compuestos fenólicos	*Enterolobium cyclocarpum* a *Gliricidia sepium*	Hoja	150 g/kg MS	México	*Bos taurus* x *Bos indicus*
Moscoso *et al*. (2017)	Taninos	*Castanea spp*	Extracto	10, 20 g/kg MS	Perú	Suizo marrón x cruza
Norris *et al*. (2020)	Taninos	*Lysiloma divaricatum*	Extracto	15, 30, 45 g/kg MS	Estados Unidos	Cruces británicos
Okedoyin *et al*. (2024)	Terpenoides	*Pimpinella anisum*, *Syzygium aromaticum*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* L.	Aceite	4 ml/d	Estados Unidos	Angus negro
Pena-Bermudez *et al*. (2022)	Compuestos fenólicos	*Ilex paraguariensis*	Extracto	5, 10, 20 g/kg MS	Brasil	Nellore
Perna Junior *et al*. (2023)	Taninos	*Acacia mearnsii*	Extracto	5, 10, 15 g/kg MS	Brasil	Nellore
Phesatcha *et al*. (2020)	Taninos	*Flemingia macrophylla*	Harina	49, 52, 53 g/kg MS	Tailandia	Nativa Tailandesa
Poornachandra *et al*. (2019)	Taninos y saponinas	*Tamarindus indica*, *Sapindus mukorossi*,	Corteza, extracto	7.1, 4.3 g/kg MS	India	Holstein Friesian ×

		mixture				Hallikar
Silva *et al*. (2024)	Taninos	*Acacia mearnsii*	Extracto	8, 16, 32 g/kg MS	Brasil	Nellore
Sommai *et al*. (2024)	Flavonoids	*Alternanthera sissoo*	Hoja	20, 40, 60, 80 g/kg MS	Tailandia	Nativa Tailandesa
Stewart *et al*. (2019)	Taninos	*Lotus corniculatus* L., *Onobrychis viciifolia Scop*, *Sanguisorba minor*	Hoja	0.2, 0.2, 0.1,0.6, 2.5, 4.5 g/kg MS	Estados Unidos	Angus
Stifkens *et al*. (2022)	Taninos	*Leucaena leucocephala*	Hoja	180, 360, 480 g/kg MS	Australia	Droughtmaster
Teobaldo *et al*. (2022)	Taninos	*Vitis vinifera* L.	Bayas	1.5 g/kg MS	Brasil	Nellore
Tseu *et al*. (2021)	Taninos	*Acacia mearnsii*	Corteza	7.5, 15, 22.5 g/kg MS	Brasil	Nellore
van Cleef *et al*. (2021)	Taninos	*Sericea lespedeza*	Hoja	9.5, 36.3, 59.7, 82.3 g/kg MS	Estados Unidos	Cruza de angus
Vazquez-Carrillo *et al*. (2020)	Taninos	*Cosmos bipinnatus*, *Matricaria chamomilla; Cymbopogon citratus*	Hoja	365, 365; 100, 280, 411, 572 g/kg MS	México	Charolais × Brown Swiss
Viennasay y Wanapat (2020)	Taninos y saponinas	*Flemingia macrophylla*	Hoja	200, 400, 600 g/kg MS	Tailandia	Cruza
Wanapat *et al*. (2018)	Taninos	*Musa paradisiaca* L.	Flor	29.4, 56.0 g/kg MS	Tailandia	Búfalo
Wanapat *et al*. (2021)	Compuestos fenólicos	*Musa paradisiaca* L., *Carica papaya*, *Ananas comosus*, *Citrus sinensis*	Cáscara	150 g/kg MS	Tailandia	Steers
Wann *et al*. (2019)	Compuestos fenólicos	*Tiliacora triandra*	Hoja	28.96, 19.94, 10.31 g/kg MS	Tailandia	Nativa tailandesa

*En este estudio, se utilizó una mezcla comercial de aceite esencial de cinamaldehído sin mencionar la planta de extracción. Compuestos fenólicos: compuestos reportados como una categoría general o fenoles que no incluyen flavonoides ni taninos.

En los artículos analizados destacaron el uso de seis categorías de metabolitos secundarios, entre los que los taninos resultaron ser los más frecuentes, presentes en el 58.14 % de las publicaciones revisadas. A continuación, se situó la presencia combinada de taninos y saponinas, que representó el 13.95 % del total. Solo el 11.63 % de los artículos definió la inclusión de compuestos fenólicos o fenoles sin hacer referencia al tipo de metabolito utilizado. Los monoterpenos, terpenos y terpenoides se mencionaron en el 9.3 % de los estudios, mientras que los fenoles y los flavonoides se mencionaron en el 6.98 % de los estudios (Tabla 1).

Composición de la dieta

Las raciones utilizadas en los estudios analizados para la síntesis narrativa presentaban una variabilidad considerable (Tabla 2). El contenido de materia seca oscilaba entre 344 y 963 g/kg, con un coeficiente de variación (CV) del 28 %. Las fracciones de fibra mostraron rangos considerables: la fibra detergente neutra (FDN) osciló entre 61.8 y 747 g/kg y la fibra detergente ácida (FDA) entre 20.0 y 741 g/kg, ambas con elevados coeficientes de variación (39-53 %), lo que indica que las raciones presentaban proporciones variables de forraje y concentrado. Del mismo modo, el contenido de extracto etéreo y de almidón mostró una variabilidad significativa, con CV del 79 % y del 94 %, respectivamente. La concentración media de extracto etéreo en las raciones para rumiantes fue del 3.59 %, mientras que la inclusión media de almidón fue del 17.27 %. Estos parámetros están estrechamente relacionados con las alteraciones en la fermentación ruminal. La inclusión de metabolitos secundarios fue notablemente heterogénea y asimétrica. Por ejemplo, los taninos presentaban una media de 17.3 g/kg de materia seca, con un máximo de 167 g/kg, y mostraban una amplia distribución (asimetría = 3.09), lo que refleja un patrón caracterizado por

múltiples comparaciones con dosis bajas y un número limitado de estudios con dosis altas.

Comparación, en subgrupos, del efecto de los metabolitos secundarios sobre las emisiones de metano, la fermentación ruminal y la producción animal

Efecto de los metabolitos secundarios en la producción de metano

Según la bibliografía de referencia, el modelo de efectos aleatorios por subclase mostró que la inclusión de taninos a través de aditivos de origen vegetal en la dieta del ganado bovino de carne tendía ($p = 0.089$) a reducir la producción de metano (g/d, SMD = -0.32, $I^2 = 62.2$ % y p de Egger = 0.886). A pesar de la mayor eficacia antimetanogénica de los flavonoides y los monoterpenos frente a los taninos (CH_4/DMI, g/kg; SMD = -1.88 % y -1.49 frente a -0.64, respectivamente; $p \leq 0.05$) (Figura 2), los dos primeros tuvieron un efecto significativo y homogéneo, aunque con un número reducido de comparaciones ($n < 10$), al igual que ocurre con los compuestos fenólicos.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de dietas (en base a materia seca) que incorporan metabolitos secundarios en dietas de bovinos de carne

Variable	n	Promedio	Min	Max	DE	EE	CV	Skewness	Kurtosis
MS, g/kg	90	719.40	344	963.4	201.8	21.27	28.05	-0.49	-1.28
MO, g/kg	72	911.81	737	973.0	43.07	5.080	4.720	-1.69	3.52
PC, g/kg	120	139.07	9.70	287.0	39.64	3.620	28.51	0.31	2.90
FDN, g/kg	122	410.72	61.8	747.0	160.9	14.57	39.19	0.17	-0.81
FDA, g/kg	93	262.74	20.0	741.0	139.3	14.44	53.01	0.20	0.05
EE, g/kg	47	35.91	3.56	176.0	28.36	4.140	78.95	2.69	10.31
Almidón, g/kg	27	172.75	4.00	524.0	162.7	31.31	94.17	0.66	-0.99
Cenizas, g/kg	46	287.38	6.16	771.0	299.5	44.16	104.2	0.68	-1.45
EB, Mcal/kg	43	4.32	3.58	5.39	0.495	0.075	11.5	0.58	0.29
ENg, Mcal/kg	23	1.03	0.76	1.260	0.210	0.040	20.00	-0.17	-1.89
Taninos, g/kg	84	17.32	0	167.0	29.50	3.220	170.4	3.09	10.85
Terpenos, g/kg	5	3.00	0	8.000	3.160	1.410	105.4	0.57	-1.55
Terpenoides, g/kg	8	0.27	0	0.400	0.190	0.070	69.57	-0.56	-1.76
Saponinas, g/kg	12	1.73	0	6.300	2.290	0.660	132.9	0.85	-0.97
Compuestos fenólicos, g/kg	7	13.46	0	28.96	10.00	3.780	74.28	0.17	-1.58
Fenoles, g/kg	5	42.00	0	150.0	62.21	27.82	148.1	0.92	-1.10
Flavonoides, g/kg	8	7.19	0	50.00	17.34	6.130	241.3	1.84	1.66
Taninos + saponinas, g/kg	4	0.20	0	0.400	0.230	0.120	115.5	0.00	-2.44
Monoterpenos, g/kg	3	2.50	0	5.000	2.500	1.440	100.0	0.00	-2.33

MS: Materia seca; MO: Materia orgánica; PC: Proteína cruda; FDN: Fibra detergente neutra; FDA: Fibra detergente ácida; EE: Extracto etéreo; ENg: Energía neta de ganancia; EB: Energía bruta; n: Número de comparaciones; Mín: Mínimo; Máx: Máximo; DE: Desviación estándar; EE: Error estándar; CV: Coeficiente de variación; Compuestos fenólicos: compuestos reportados como una categoría general o fenoles que no incluyen flavonoides ni taninos; Skewness and kurtosis: Representan el grado de asimetría y distribución alrededor de sus medias, respectivamente.

En el caso de los taninos, el análisis de sensibilidad (Material Suplementario 2) mostró que el efecto reducido del CH_4 expresado como pérdidas energéticas (% de ingesta de GE) y concentración molar (mmol/L) dependía del sesgo de publicación más que de la inclusión de metabolitos secundarios, con la excepción del rendimiento de CH_4 (g/kg de DMI), donde el efecto antimetanogénico de los taninos fue consistente (SMD = -0.463; IC del 95 %: 0.688 a -0.238) [n = 8]). El análisis de recorte y relleno se recoge en el Material Suplementario 3.

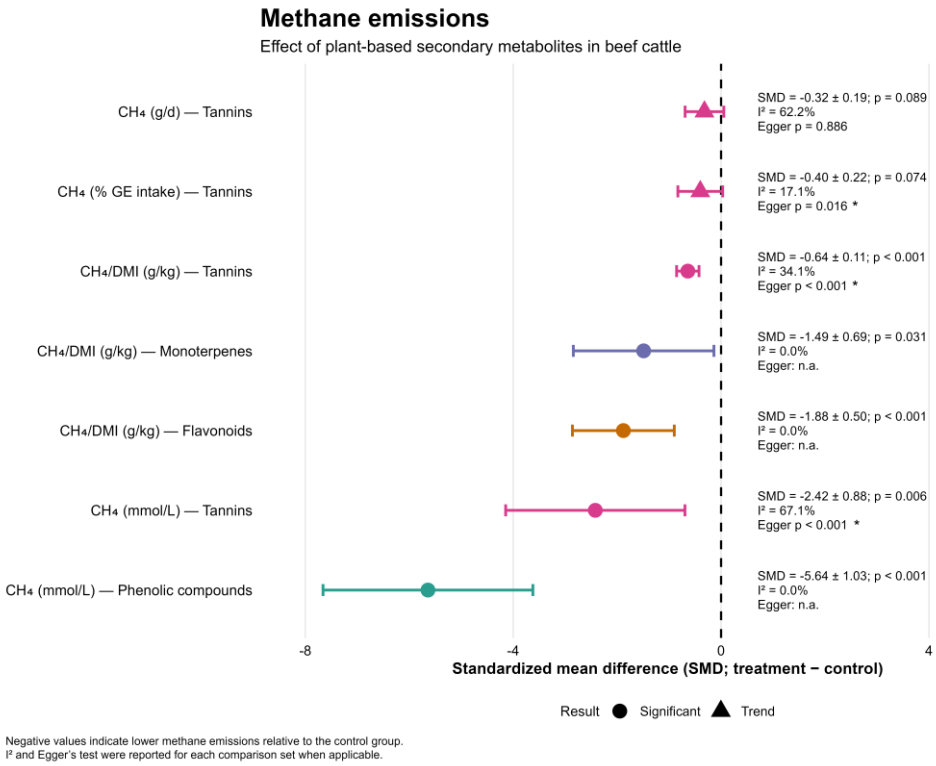

Figure 2. The forest plot ilustra el impacto de los metabolitos secundarios de origen vegetal en las emisiones de metano en el ganado bovino de carne. Compuestos fenólicos: compuestos fenólicos no flavonoides y no taninos, o compuestos incluidos como categoría general. El análisis empleó un modelo de efectos aleatorios para cada subclase de metabolitos, teniendo en cuenta únicamente los resultados con p ≤ 0.10; SMD: diferencia media estandarizada. *Tamaño del efecto «trim and fill» (SMD) (IC del 95 %) [n = estudios imputados]: CH_4 (% de ingesta de GE) — Taninos = -0.046 (-0.528 a 0.436) [n = 4], CH_4/DMI (g/kg) — Taninos = -0,463 (-0.688 a -0.238) [n = 8], CH_4 (mmol/L) — Taninos = -0.617 (-2.855 a 1.620) [n = 4].

Efecto de los metabolitos secundarios sobre los parámetros de fermentación

La incorporación de taninos en la alimentación del ganado bovino de carne moduló la fermentación ruminal, favoreciendo una mayor producción de propionato (SMD ajustada = 0.307; IC del 95 %: 0.088–0.527 [n = 6]), pero no mostró efectos significativos sobre la producción de acetato (SMD ajustada = 0.196, IC del 95 %: -0.018–0.411 [n = 9]) ni en la relación acetato:propionato (SMD ajustada = -0.204, IC del 95 %: -0.453–0.046 [n = 9]) tras ajustar las SMD por el sesgo de publicación. Los efectos del propionato (RMD = 24.96 y SMD = 2.501, p ≤ 0.001) y del butirato (SMD = 5.526, p ≤ 0.001) fueron similares en el caso de los terpenos, pero no en el de los terpenoides, que disminuyeron la fermentación ruminal al reducir la producción total de AGV (RMD = -4.3, p = 0.03). Sin embargo, a pesar de la baja homogeneidad, no se evaluó el riesgo de sesgo de publicación debido al reducido número de comparaciones; por lo tanto, se debe actuar con cautela a la hora de generalizar estos resultados.

El efecto de la inclusión de taninos sobre el pH (RMD = 0.047; p = 0.066; p de Egger = 0.288) indica una alcalinización del entorno ruminal. En cuanto a los terpenoides, la coherencia entre los resultados (I^2 = 0 %) sugiere un pH más alto (RMD = 0.106, p = 0.03 y SMD = 0.516), lo que estaría relacionado con una menor tasa de fermentación y una mayor concentración de NH_3-N. Sin embargo, no se puede descartar el sesgo de publicación como causa de estos efectos mediados por los terpenoides. Los compuestos fenólicos (heterogeneidad >90 %, sin prueba de Egger) parecían favorecer la producción total de AGV (mmol/L) con una menor producción de acetato (RMD = -2.426, p = 0.034) y butirato (RMD = -0.648 y SMD = -1.42, p ≤ 0.05), y una mayor producción de propionato (RMD = 3.135 y SMD = 2.599, p < 0,001). Con menor

heterogeneidad ($I^2 < 35$ %), pero sin evaluar el riesgo de sesgo de publicación, tanto los compuestos fenólicos (RMD = -0.761 y SMD = -2.47, $p < 0.001$) y los taninos (RMD = -80.13 y SMD = -1.5, $p < 0.001$) mostraron capacidad de defaunación al reducir las poblaciones de protozoos.

Efecto de los metabolitos secundarios en la producción animal

En este análisis de subgrupos (Tabla 3), la suplementación con metabolitos secundarios de origen vegetal no tuvo ningún efecto significativo sobre el rendimiento productivo ($p > 0.05$). En cuanto a la ingesta de nutrientes y según los artículos citados, los taninos favorecieron la ingesta de materia orgánica (kg de materia seca/día, RMD = 0.066, $p = 0.01$, p de Egger = 0.653), pero redujeron la ingesta de energía bruta (Mcal/día). Esta respuesta en la ingesta energética se mantuvo (SMD ajustada = -0.146; IC del 95 %: -0.24 a -0.052 [n = 2]) tras el análisis **"**trim and fill**"**.

El ajuste por sesgo de publicación indicó que el efecto observado de los taninos en el aumento de la ingesta de materia seca (MS), proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) no fue significativo tras el análisis «trim-and-fill». Los flavonoides tuvieron un efecto significativo sobre la ingesta de nutrientes, caracterizado por una menor ingesta de materia seca (SMD = -0.348), asociada a una reducción en el consumo de FDN (SMD = -0.272) y FDA (SMD = -0.153), y a un aumento en la ingesta de energía bruta (RMD = 1.939). Por el contrario, los compuestos fenólicos favorecieron la ingesta de materia orgánica (SMD = 1.966), proteína bruta (CP) (SMD = 1.019) y fracciones de fibra (SMD > 0.6). Sin embargo, a pesar de su efecto significativo ($p < 0.05$), su elevada homogeneidad ($I^2 < 50$ %) y el reducido número de comparaciones para estas variables de respuesta ($n < 10$), se deben tener en cuenta.

Cuadro 3. Comparación en subgrupos del efecto de los metabolitos secundarios sobre las variables fermentativas en bovinos de carne

Variable	Metabolito	k DMC/DME	Estimaciones del tamaño del efecto				Prueba de heterogeneidad		Sesgo de publicación	
			DMC	Valor de *P*	DME	Valor de *P*	DMC I^2 (%)	DME I^2 (%)	Egger *P*	"Trim and fill" del tamaño del efecto DME (95% IC) [n= estudios imputados]
Acetato (%)	Compuestos fenólicos	7	-2.426	0.034	-1.870	0.058	98.7	89.3	-	-
	Taninos	23	-1.669	0.074	-0.010	0.917	92.2	5.60	<0.001	0.196 (-0.018 to 0.411) [n=9]
Propionato (%)	Compuestos fenólicos	7	3.135	<0.001	2.599	<0.001	96.4	48.2	-	-
	Taninos	23	1.915	0.005	0.457	<0.001	97.2	0	<0.001	0.307 (0.088 to 0.527) [n=6]
	Terpenos	4	24.960	<0.001	2.501	<0.001	0	0	-	-
Butirato (%)	Compuestos fenólicos	7	-0.648	0.012	-1.420	0.033	85.4	79.5	-	-
	Terpenos	4	16.110	<0.001	5.526	<0.001	61.5	0	-	-
Acetato: propionato	Compuestos fenólicos	7	-0.477	<0.001	-2.080	<0.001	93.1	35.1	-	-
	Taninos	26	-0.229	<0.001	-0.450	<0.001	59.2	9.20	0.004	-0.204 (-0.453 to 0.046) [n=9]
AGV Totales (mmol/L)	Compuestos fenólicos	4	4.620	<0.001	0.914	0.018	0	0	-	-
	Terpenoides	5	-4.300	0.049	-0.450	0.090	0	0	-	-
pH ruminal	Taninos	32	0.047	0.066	0.130	0.211	63.0	0	0.288	-
	Terpenoides	5	0.106	0.030	0.516	0.050	0	0	-	-
NH_3-N (mg/dL)	Terpenoides	5	2.080	<0.001	1.265	0.001	62.5	42.2	-	-
Protozoarios ($\times 10^5$/mL)	Compuestos fenólicos	4	-0.761	<0.001	-2.470	<0.001	34.8	0	-	-
Protozoarios totales ($\times 10^3$/mL)	Taninos	6	-80.130	<0.001	-1.500	<0.001	0	30.1	-	-

AGV: Ácidos grasos volátiles; Compuestos fenólicos: compuestos reportados como una categoría general o fenoles que no incluyen flavonoides ni taninos; DMC: diferencia de media bruta y su intervalo de confianza (IC) asociado del 95%; DME: diferencia de media estandarizada y su intervalo de confianza (IC) asociado del 95%; I^2: porcentaje de variación, k: número de comparaciones (tratamiento vs. testigo); k DMC y k DME: El número de comparaciones para DMC y DME fue el mismo para ambas diferencias de medias.

Cuadro 4. Comparación en subgrupos del efecto de los metabolitos secundarios sobre las variables productivas en bovinos de carne

Variable	Metabolito	k DMC/DME	Estimaciones del tamaño del efecto				Prueba de heterogeneidad		Sesgo de publicación	
			DMC	Valor de *P*	DME	Valor de *P*	DMC I^2 (%)	DME I^2 (%)	Egger *P*	Trim and fill del tamaño del efecto DME (95% IC) [n= estudios imputados]
Comportamiento productivo										
Peso final (kg)	Flavonoides	3	-4.1	0.350	-0.152	0.362	0	0	-	-
	Taninos	11	-3.334	0.299	-0.161	0.377	52.9	37.9	0.152	-
GDP (kg/d)	Taninos	21	-0.023	0.446	-0.01	0.922	75.6	0	0.073	-0.017 (-0.187 to 0.152) [n=1]
	Flavonoides	3	-0.067	0.181	-0.218	0.193	0	0	-	-
Conversión alimenticia	Flavonoides	6	-0.001	0.659	-0.035	0.768	20	0	-	-
	Taninos	9	0.002	0.418	0.19	0.182	3.9	0	-	-
Consumo de nutrients en base seca, kg/d										
MS	Compuestos fenólicos	10	0.484	<0.001	1.798	0.004	87.7	80.4	<0.001	0.988 (-0.289 to 2.265) [n=7]
	Compuestos fenólicos	3	-0.117	<0.001	-0.654	0.435	0.1	76.8	-	-
	Flavonoides	9	-0.348	0.013	-0.272	0.005	10.2	0	-	-
	Taninos	73	0.336	0.01	0.09	0.164	96.2	12.9	<0.001	0.048 (-0.062 to 0.157) [n=3]
	Terpenos	4	0.322	0.631	0.137	0.666	0	0	-	-
MO	Compuestos fenólicos	3	0.367	<0.001	1.966	<0.001	0	0	-	-
	Taninos	23	0.066	0.01	0.111	0.383	1.7	0	0.653	-
PC	Compuestos fenólicos	6	0.066	<0.001	1.019	<0.001	0	0	-	-
	Flavonoides	3	-0.03	0.756	-0.051	0.76	0	0	-	-
	Taninos	26	0.002	<0.001	0.291	0.095	0	37.5	<0.001	0.315 (-0.021 to 0.652) [n=2]

	Terpenos	4	0.05	0.677	0.118	0.709	0	0	-	-
FDN	Compuestos fenólicos	6	0.141	0.007	0.613	0.024	32.3	0	-	-
	Flavonoides	3	-0.277	0.024	-0.369	0.028	0	0	-	-
	Taninos	25	0.166	0.09	-0.013	0.919	94.4	0	0.031	-0.013 (-0.327 to 0.171) [n=0]
	Terpenos	4	0.065	0.689	0.113	0.721	0	0	-	-
FDA	Compuestos fenólicos	6	0.114	0.008	0.748	0.007	64	0	-	-
	Flavonoides	3	-0.153	0.037	-0.341	0.042	0	0	-	-
	Taninos	18	0.162	0.112	-0.055	0.725	98.6	0	0.006	-0.055 (-0.460 to 0.153) [n=0]
EE	Compuestos fenólicos	3	0.017	0.799	0.078	0.814	0	0	-	-
	Taninos	7	0.053	0.27	0.366	0.259	77.2	48	-	-
	Terpenos	4	0.012	0.556	0.168	0.596	0	0	-	-
GE (Mcal/d)	Flavonoides	3	1.939	0.08	0.521	0.127	0	0	-	-
	Monoterpenos	2	0.09	0.994	0.004	0.995	0	0	-	-
	Taninos	13	-1.982	0.059	-0.147	0.414	10.5	0	0.081	-0.146 (-0.240 to -0.052) [n=2]
EM (Mcal/d)	Taninos	6	-0.218	0.356	-0.249	0.295	0	0	-	-

GDP: ganancia diaria promedio; MS: materia seca; MO: materia orgánica; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutra; FDA: fibra detergente ácida; EE: extracto etéreo; GE: energía bruta; ME: energía metabolizable; Compuestos fenólicos: compuestos reportados como una categoría general o fenoles que no incluyen flavonoides ni taninos; DMC: diferencia de media cruda y su intervalo de confianza (IC) asociado del 95%; DME: diferencia de media estandarizada y su intervalo de confianza (IC) asociado del 95%; I^2: porcentaje de variación; k: número de comparaciones (tratamiento vs. control); k DMC y k DME: El número de comparaciones para DMC y DME fue el mismo para ambas diferencias de medios.

Análisis de meta-regresión

El análisis de metarregresión (Tabla 5) aclara los factores moderadores que influyen en las variables medidas y sus efectos. La producción de metano (CH_4), expresada en mmol/L y gramos al día (g/d), se vio influida de forma significativa ($p \leq 0.05$) por el aditivo de origen vegetal utilizado. Además, en el caso de la producción de CH_4 expresada en g/d, se observó un efecto estadísticamente significativo en relación con la parte de la planta utilizada. Sin embargo, los valores bajos o negativos de R^2 indican una heterogeneidad considerable.

El análisis del coeficiente ß (Tabla 6) indicó que la inclusión de flores de plátano tuvo el efecto reductor más significativo sobre la producción de CH_4 (mmol/L, $p < 0.001$), lo que implica una influencia directa en la fermentación ruminal y en la disponibilidad de hidrógeno. Por el contrario, la *Acacia mimosa* y la madera de castaño, evaluadas en forma de extractos, mostraron reducciones sustanciales (SMD = -2.56 y SMD = -2.521, respectivamente) en la producción de CH_4 (g/d; $p \leq 0.05$) en comparación con el testigo, lo que sugiere un efecto general sobre los animales. En cuanto al metabolismo del nitrógeno, la concentración de NH_3-N (mg/dL) disminuyó notablemente tras la administración de *Anacardium occidentale* L. y *Cymbopogon citratus* ($p = 0.008$), lo que indica una menor degradación de las proteínas ruminales. Por el contrario, la inclusión de flores de plátano elevó la concentración de NH_3-N ($p < 0.001$), lo que podría estar asociado a la estabilización del pH ruminal.

Cuadro 5. Meta-regresión del efecto de los metabolitos secundarios sobre las variables fermentativas en bovinos de carne

Variable	Moderador	QM	Valor de *P*	R^2	Tau^2
CH_4 (mmol/L)	Dosis	2.02	0.16	14.71	5.410
	Aditivo	66.05	<0.001	>99.9	<0.001
	Forma del aditivo	3.80	0.15	6.10	5.950
	Forraje: concentrado	3.47	0.18	6.91	5.900
CH_4 (g/d)	Dosis	0.24	0.62	0.00	0.650
	Aditivo	46.83	0.01	0.00	0.610
	Forma del aditivo	25.75	<0.001	23.24	0.460
	Forraje: concentrado	28.76	<0.001	12.49	0.530
AGV totales (mmol/L)	Dosis	14.54	<0.001	77.98	0.090
	Aditivo	65.28	<0.001	>99.9	<0.001
	Forma del aditivo	39.14	<0.001	80.18	0.080
	Forraje: concentrado	42.68	<0.001	>99.9	<0.001
NH_3-N (mg/dL)	Dosis	2.66	0.10	1.90	3.900
	Aditivo	144.50	<0.001	93.38	0.260
	Forma del aditivo	34.23	<0.001	0.00	4.250
	Forraje: concentrado	47.92	<0.001	67.01	1.310
Protozoarios ($\times 10^5$/mL)	Dosis	1.88	0.17	0.00	10.44
	Aditivo	18.88	0.03	32.72	6.520
	Forma del aditivo	17.90	<0.001	55.47	4.320
	Forraje: concentrado	14.94	<0.001	48.34	5.010

AGV: ácidos grasos volátiles; QM: coeficiente de moderador, es considerado estadísticamente significativo con valor de $p \leq 0.05$; R^2: grado de heterogeneidad; Tau^2: varianza entre estudios.

Cuadro 6. Meta-regresión que presenta coeficientes beta para conocer la influencia de los metabolitos secundarios en las emisiones de metano y los parámetros fermentativos en bovinos de carne

Variable	Moderador	Autor	Descripción del aditivo	Dosis	ß	Valor de *P*
CH_4 (mmol/L)	Dosis				-0.006	0.011
	Aditivo (*Musa paradisiaca* L.)	Wanapat *et al*. (2018)	Flor	29.4, 56.0 g/kg DM	-8.558	<0.001
CH_4 (g/d)	Aditivo (*Acacia mimosa*)	Fagundes *et al*. (2020)	Extracto	12.5, 25 g/kg DM	-2.560	0.006
	Aditivo (*Cymbopogon citratus*)	Khejornsart *et al*. (2024)	Hoja	1.66, 1.63, 1.67, 1.66 g/kg DM	-1.878	0.035
		Vazquez-Carrillo *et al*. (2020)		100, 280, 365, 411, 572 g/kg DM		
	Aditivo (*Leucaena leucocephala*)	Stifkens *et al*. (2022)	Hoja	180, 360, 480 g/kg DM	2.770	0.003
	Aditivo (*Lotus tenu*is)	González *et al*. (2025)	Hoja	0.21, 0.48 g/kg DM	-1.659	0.011
	Aditivo (Madera *Castanea spp*.)	Moscoso *et al*. (2017)	Extracto	10, 20 g/kg DM	-2.521	0.001
	Aditivo (*Vitis vinifera* L.)	Caetano *et al*. (2019)	Residuo solido	31.2 g/kg DM	-1.626	0.076
	Aditivo (*Pharbitis nil*)	Bharanidharan *et al*. (2024)	Semilla	50.0 g/kg DM	-1.570	0.088
	Aditivo (*Sanguisorba minor*)	Stewart *et al*. (2019)	Hoja	0.2, 0.2, 0.1,0.6, 2.5, 4.5 g/kg DM	-1.348	0.035
	Aditivo (*Castanea spp.* and *Lysiloma divaricatum*)	Magnani *et al*. (2023)	Extracto	0.70 g/kg DM	-1.752	0.059
		Mezzomo *et al*. (2018)		25.0 g/kg DM		
	Presentación del aditivo (*Acacia mearnsii*)	Tseu *et al*. (2021)	Corteza	7.5, 15, 22.5 g/kg DM	-5.200	<0.001
AGV totales (mmol/L)	Dosis				0.003	0.060
	Aditivo (*Musa paradisiaca* L.)	Wanapat *et al*. (2018)	Flor	29.4, 56.0 g/kg DM	6.485	<0.001
	Aditivo (*Lysiloma*	Norris *et al*. (2020)	Extracto	15, 30, 45 g/kg DM	1.360	0.062

	divaricatum)					
	Aditivo (*Tiliacora triandra*)	Wann *et al*. (2019)	Hoja	28.96, 19.94, 10.31 g/kg DM	2.110	0.009
NH_3-N (mg/dL)	Unidad (ml/d)	Benetel *et al*. (2024)	Aceite esencial de orégano	3.0 ml/kg DM	2.838	<0.001
		Okedoyin *et al*. (2024)	Anís, clavo, orégano, menta	4.0 ml/d		
	Aditivo (*Anacardium occidentale* L.)	Khejornsart *et al*. (2024)	Hoja	1.66, 1.63, 1.67 and 1.66 g/kg DM	-4.621	0.008
	Aditivo (*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*)	Coneglian *et al*. (2019)	Aceite	1, 2, 4, 8 g/kg DM	1.568	0.030
	Aditivo (*Cymbopogon citratus*)	Khejornsart *et al*. (2024)	Hoja	1.66, 1.63, 1.67, 1.66 g/kg DM	-4.528	0.008
		Vazquez-Carrillo *et al*. (2020)		100, 280, 365, 411, 572 g/kg DM		
	Aditivo (*Careya arborea*)	Khejornsart *et al*. (2024)	Hoja	1.66, 1.63, 1.67, 1.66 g/kg DM	-7.948	0.001
	Aditivo (*Leucaena leucocephala*)	Stifkens *et al*. (2022)	Hoja	180, 360, 480 g/kg DM	3.822	0.072
	Aditivo (*Musa paradisiaca* L.)	Wanapat *et al*. (2018)	Flor	29.4, 56.0 g/kg DM	41.48	<0.001
	Aditivo (*Schinopsis lorentzii* and *Castanea* spp.)	Cidrini *et al*. (2022)	Extracto	7.0 g/kg DM	1.914	0.048
	Aditivo (*Tiliacora triandra*)	Wann *et al*. (2019)	Hoja	28.96, 19.94, 10.31 g/kg DM	3.001	0.001
Protozoarios ($\times 10^5$/mL)	Aditivo (*Musa paradisiaca* L., *Carica papaya*, *Ananas comosus*, *Citrus sinensis*)	Wanapat *et al*. (2021)	Cáscara	150 g/kg DM	-25.09	0.096

AGV: ácidos grasos volátiles; ß: valor de beta; es considerado significativo con $p \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

La producción de rumiantes contribuye de manera significativa a las emisiones de metano; por lo tanto, es esencial analizar estrategias de mitigación, en el contexto alimentario, de la fermentación ruminal (Sun *et al*., 2023). El rumen alberga un ecosistema altamente especializado (bacterias, arqueas, protozoos ciliados, hongos anaeróbicos, entre otros), y sus interacciones regulan el flujo de carbono y electrones durante la fermentación (Henderson *et al*., 2020). La composición de la dieta basal (MS, FDN y FDA), el almidón y el extracto etéreo determina el patrón de fermentación predominante y la disponibilidad de hidrógeno (Xiao y Meng, 2024).

Las dietas ricas en fibra favorecen a las bacterias fibrolíticas, como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*, lo que promueve la formación de acetato, CO_2 y H_2 (Phesatcha *et* al., 2020) y, en consecuencia, aumenta el suministro de equivalentes reductores para la metanogénesis (Beauchemin *et al*., 2020). Por el contrario, las dietas con un mayor contenido en almidón estimulan a las bacterias amilolíticas y productoras de succinato y propionato, como *Prevotella spp*., *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii*, que compiten por el H_2 al promover la formación de propionato (Kotz *et al*., 2020; Ungerfeld, 2020). En este sentido, el efecto de los metabolitos secundarios aportados por los aditivos de origen vegetal sobre la respuesta productiva de los rumiantes comprende una compleja red de interacciones entre la ecología microbiana, la dinámica de la fermentación, el tipo de dieta y el metabolismo del huésped (Priyashantha *et al*., 2026; Tedeschi *et al*., 2021).

Efecto de los metabolitos secundarios en la producción de metano

Ku-Vera *et al*. (2020) observaron que el uso de metabolitos secundarios de origen

vegetal se ha convertido en una estrategia para modular los procesos de fermentación y redirigir el flujo de hidrógeno hacia vías alternativas que eviten la producción de metano (CH_4).

Taninos

El presente metaanálisis demuestra que la aplicación de aditivos de origen vegetal ricos en compuestos fenólicos, como los taninos, reduce la producción de metano. Esta reducción indica una mejora en la eficiencia fermentativa de la dieta (Ungerfeld, 2020). El efecto de los taninos sobre la producción de CH_4 por unidad de ingesta de materia seca (g/kg) indica que la modulación observada parece implicar una modificación de las vías metabólicas responsables de su formación (Zhang *et al*., 2022). Desde un punto de vista microbiológico, la metanogénesis en el rumen se produce predominantemente a través de la vía hidrogenotrófica, aunque también existen las vías metilotrófica y acetoclástica (Hassan *et al*., 2020; Lambie *et al*., 2015). La vía hidrogenotrófica (CO_2 + $4H_2 \rightarrow CH_4$) contribuye a más del 80 % del metano producido en el rumen y está mediada principalmente por arqueas del género *Methanobrevibacter* (Sun *et al*., 2023).

La reducción de la producción de metano tras la administración de taninos indica un impacto directo sobre la actividad metanogénica o la disponibilidad de H_2. Los metabolitos secundarios intervienen a través de diversos mecanismos, entre los que se incluyen la limitación indirecta del H_2 disponible mediante alteraciones en el patrón de fermentación (Ku-Vera *et al*., 2020), la inhibición directa de las arqueas metanogénicas (Bhatta *et al*., 2009), la modificación de la permeabilidad de las membranas bacterianas y arqueas (Hassan *et al*., 2020), la reducción de las

actividades enzimáticas clave, como la metil-coenzima M reductasa, responsable de la etapa final de la síntesis de metano (Zhang *et al*., 2022), y una disminución de la transferencia interespecífica de H_2 a las arqueas asociadas a las superficies de los protozoos debido a un efecto de defaunación que reduce las poblaciones microbianas (Jayanegara *et al*., 2011). Este fenómeno merma la eficiencia de la metanogénesis (López-García *et al*., 2022) y aporta pruebas de que ciertos metabolitos secundarios pueden reducir la abundancia de arqueas metanogénicas, como *Methanosphaera*, al tiempo que aumentan la abundancia relativa de bacterias celulolíticas, como *Fibrobacter* (Cremonesi *et al*., 2023), lo que confirma una reestructuración del ecosistema microbiano más que un mero efecto inhibidor directo de los metabolitos secundarios.

Además, la considerable variabilidad en las tasas de inclusión observadas en este estudio, especialmente en el caso de los taninos (media = 17.32; CV = 170.4 %), concuerda con los resultados de Orzuna-Orzuna *et al*. (2021), quienes, en un metaanálisis, informaron de rangos comprendidos entre 0.46 y 60 g/kg de materia seca, y con los de Jayanegara *et al*. (2011), que utilizaron 40, 59 y 79 g/kg de materia seca, respectivamente. Esto demuestra que la magnitud del efecto depende de la dosis administrada. Jayanegara *et al*. (2011) observaron una disminución lineal significativa de las emisiones de metano a medida que aumentaba la concentración de taninos en la dieta (0.109 mL de CH_4 por g/kg de MS adicional de taninos suministrado). De manera similar, Orzuna-Orzuna *et al.* (2021) confirmaron que la suplementación con taninos reducía eficazmente las emisiones de metano entérico en el ganado bovino; sin embargo, además de la dosis incluida, destacaron la importancia de la fuente y el tipo de taninos como factores determinantes de la respuesta observada.

Flavonoides y monoterpenos

Los resultados de esta revisión indican que otras clases de metabolitos secundarios de origen herbal, en particular los flavonoides y los monoterpenos, podrían producir reducciones aún mayores en las emisiones de metano en relación con el consumo de alimento. Aunque estos resultados deben analizarse con cautela debido al reducido número de comparaciones y a la falta de análisis del riesgo de sesgo de publicación, el efecto antimetanogénico de los flavonoides y los monoterpenos podría estar asociado a alteraciones en la abundancia relativa de arqueas pertenecientes al género *Methanobrevibacter* (Zhang *et al*., 2022), que constituye el grupo metanogénico predominante en el rumen bovino, en particular las especies relacionadas con *M. gottschalkii* y *M. ruminantium* (Henderson *et al*., 2020). La modulación de estas especies se ha relacionado con reducciones en las emisiones de metano (mL/g de materia seca) del 27.3 % y del 6.87 %, respectivamente, cuando se administraron suplementos de 30 y 50 mg/L de extracto de *Pinus densiflora*, que es una fuente rica en compuestos bioactivos como los flavonoides y los terpenos (Lee *et al*., 2020). Los resultados de este metaanálisis sobre los efectos de los flavonoides y los monoterpenos en la ingesta de CH_4/MS (g/kg) sugieren que estos metabolitos secundarios de las plantas no solo disminuyen la abundancia relativa de metanógenos, sino que también modifican el equilibrio general de hidrógeno dentro del sistema de fermentación (Ungerfeld, 2020), y que la mitigación del metano puede no depender únicamente de la tasa de inclusión, sino también del perfil fitoquímico específico del aditivo.

Efecto de los metabolitos secundarios sobre los parámetros de fermentación

Taninos

La redistribución del hidrógeno también se refleja en los perfiles de ácidos grasos volátiles. El aumento de la proporción de propionato observado con la suplementación con taninos respalda la hipótesis de que los equivalentes reductores se redirigen hacia las vías gluconeogénicas, lo que disminuye la disponibilidad de electrones para la metanogénesis (Pang *et al*., 2023; Ungerfeld, 2020). De hecho, se ha descrito en la literatura que una mayor abundancia relativa de *Prevotellaceae* y *Succinivibrionaceae* se asocia negativamente con las emisiones de metano, ya que compiten por el H_2 (Shinkai *et al*., 2024). Desde un punto de vista energético, esta redistribución indica que parte de la energía conservada al mitigar la producción de metano podría redirigirse hacia otras vías de fermentación, mejorando así la eficiencia en la utilización de la energía metabolizable procedente de la dieta (Ungerfeld, 2020).

Además, ciertos polifenoles pueden estimular las enzimas implicadas en la vía del succinato, que está relacionada con la síntesis de propionato (Teng *et al*., 2024). Este efecto favorece la proliferación de bacterias productoras de propionato, como las de las familias *Prevotellaceae* y *Veillonellaceae* y contribuye a una mayor estabilidad del pH ruminal (Rabee *et al*., 2022), lo que explica la alcalinización del entorno ruminal con la suplementación de taninos a través de aditivos de origen vegetal.

Aunque la administración de taninos no mostró efectos sobre la producción de acetato ni sobre la relación A:P, esta última tiene importancia metabólica. La producción de acetato aumenta la disponibilidad de equivalentes reductores para la metanogénesis, mientras que la síntesis de propionato actúa como un sumidero alternativo de hidrógeno (Beauchemin *et al*., 2020).

Terpenos y terpenoides

Cada grupo de metabolitos puede favorecer o inhibir diferentes poblaciones microbianas responsables de la síntesis de acetato, propionato o butirato (Patra y Saxena, 2011). Los efectos observados con los terpenos y los terpenoides fueron homogéneos (I^2) y significativos, pero sin análisis de sesgo de publicación, lo que sugiere efectos contrastantes. Los terpenos favorecieron la producción de propionato y butirato, mientras que los terpenoides mostraron una gran capacidad para reducir la fermentación ruminal, aunque aumentaron el pH del rumen. Los resultados de este estudio sugieren que la redistribución del hidrógeno producido durante la fermentación ruminal no es uniforme y puede variar en función del tipo específico de metabolito secundario presente y de su influencia selectiva sobre los microorganismos y las vías de fermentación predominantes. Por ejemplo, los terpenoides presentan una fuerte actividad antimicrobiana que puede afectar a la proliferación de las bacterias ruminales (Delgadillo-Ruiz *et al*., 2021).

Compuestos fenólicos

En general, los compuestos fenólicos aumentaron la concentración total de AGV (mmol/L) en comparación con el grupo testigo. Esto sugiere que la reducción de CH_4 no provocó una disminución de la actividad fermentativa, sino más bien una reorientación del metabolismo ruminal, lo que ilustra que es posible mitigar las emisiones de metano sin mermar la producción total de energía fermentativa (Ungerfeld, 2020).

Además, la reducción de protozoos ($\times 10^5$/mL) observada tras la administración de taninos, un tipo de compuesto fenólico concuerda con la reducción de la metanogénesis documentada anteriormente, atribuible al efecto de defaunación que

ejercen los metabolitos secundarios sobre estos protozoos y su relación simbiótica con las arqueas metanogénicas (Jayanegara *et al*., 2011). La eficacia biológica de los metabolitos secundarios depende de su dosis y de sus efectos sobre la ingesta y la digestibilidad (Yanza *et al*., 2021).

Efecto de los metabolitos secundarios sobre el rendimiento de los animales y la ingesta de nutrientes

Desde el punto de vista de la bioenergía, el metano supone una pérdida de la energía bruta consumida (Ungerfeld, 2020). Una reducción en la producción de metano puede aumentar la proporción de energía metabolizable retenida, lo que favorece una utilización más eficiente para funciones productivas y podría compensar las variaciones en la digestibilidad (Beauchemin *et al*., 2020). Sin embargo, a pesar de las modificaciones en los procesos de fermentación y de los esfuerzos para mitigar el metano, no se observaron efectos adversos de los metabolitos secundarios de origen vegetal sobre la ganancia de peso diaria, el peso corporal final o la eficiencia alimenticia. Este hallazgo concuerda con los de Akanmu *et al*. (2026), quienes evaluaron metabolitos secundarios de origen vegetal procedentes de *Moringa oleifera*, *Jatropha curcas* y *Aloe vera* (50 mg/kg de materia seca del pienso) y concluyeron que es posible mitigar las emisiones de metano sin efectos perjudiciales sobre los parámetros de producción.

Taninos

La tendencia a aumentar la ingesta de materia orgánica con taninos puede explicarse por la menor disponibilidad de nitrógeno en la dieta en el rumen y por la capacidad de los animales para modular su ingesta con el fin de satisfacer sus necesidades de aminoácidos (Pang *et al*., 2023). Se ha documentado que las concentraciones

elevadas de taninos (>5 %) pueden formar complejos con las proteínas (Besharati *et al*., 2022; Loregian *et al*., 2023) mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. En consecuencia, estos complejos de taninos y proteínas reducen la degradación de las proteínas en el rumen, lo que da lugar a una menor síntesis de proteínas microbianas (Naumann *et al*., 2017; Patra y Saxena, 2011). Por lo tanto, llega al intestino delgado una proporción mayor de proteínas no degradadas en el rumen y una menor proporción de proteínas microbianas, respectivamente. Las proteínas microbianas aportan al menos la mitad de los aminoácidos que absorben los rumiantes (Storm y Orskov, 1983). La proliferación de los microorganismos del rumen depende de la disponibilidad de energía fermentable y de proteínas degradables en el rumen (Lima *et al*., 2023)**.** La menor disponibilidad de proteínas debido a los taninos afecta a la proliferación bacteriana (Holik *et al*., 2025) y a la capacidad fermentativa del rumen, lo que podría limitar el consumo de alimento y, por lo tanto, la ingesta de energía bruta.

Flavonoides

Este análisis demostró que la incorporación de flavonoides mediante aditivos de origen vegetal se asociaba con una reducción del consumo de materia seca, con una dosis media de 7.19 g/kg de MS y un nivel máximo de incorporación de 50 g/kg de MS. Este fenómeno puede atribuirse al hecho de que ciertas flavononas disminuyen la palatabilidad al activar los receptores del sabor amargo (Ferreira *et al*., 2015; Serra *et al*., 2021) y pueden ejercer efectos astringentes, lo que podría alterar el comportamiento alimenticio (Besharati *et al*., 2022). Este impacto en la ingesta de materia seca contrasta con los resultados de Balcells *et al*. (2012) y Jiménez-Ocampo *et al*. (2022), quienes incorporaron flavanonas a dosis de 0.06 g/kg de materia seca y

de 1.5 a 3 g/kg de materia seca, respectivamente, sin observar variaciones significativas en este parámetro, probablemente debido a que sus niveles de inclusión fueron inferiores a los descritos en este metaanálisis.

Fuentes de heterogeneidad en la respuesta de los metabolitos secundarios de origen vegetal

Por último, los metabolitos secundarios se distribuyen ampliamente por diversas estructuras vegetales, y su localización específica depende de su clasificación química. Por ejemplo, los compuestos fenólicos contribuyen principalmente a la coloración de las flores, los frutos y otros tejidos pigmentados, mientras que los flavonoides se encuentran predominantemente en las hojas, las flores, los tallos y las raíces (Twaij y Hasan, 2022). Además, ciertos terpenoides se concentran en las hojas de algunas especies (Selwal *et al*., 2023). En consecuencia, el análisis de metarregresión demostró que tanto la especie vegetal como la fracción botánica empleadas para la suplementación dietética o la extracción de metabolitos secundarios influían significativamente en el grado del efecto antimetanogénico, lo que sugiere que la respuesta no viene determinada únicamente por el tipo de metabolito secundario, sino también por su concentración, biodisponibilidad y perfil fitoquímico específico (Joch *et al*., 2018).

Las plantas enumeradas en la tabla 6 se caracterizan principalmente por su abundancia de terpenoides, flavonoides y taninos. Seis de estas plantas son leguminosas arbóreas pertenecientes a la familia *Fabaceae* (Maroyi, 2023), comúnmente conocida como la familia de las leguminosas, que tiene un importante valor económico debido a sus frutos, flores y hojas, y se considera la tercera familia de plantas terrestres más grande (Jadhavar y Deshpande, 2022). Además, incluyen

especies de la familia *Anacardiaceae* (Guerra *et al*., 2025), que comprende aproximadamente 82 géneros y unas 800 especies (Toelke *et al*., 2018), principalmente árboles y arbustos leñosos (Mitchell *et al*., 2022).

Esta familia incluye varias especies de gran importancia económica, como el Anacardo, que se caracterizan por la presencia de compuestos fenólicos (Toelke *et al*., 2018). El resto de las especies pertenecen a otras familias, entre ellas las *Fagaceae* (Shilpa *et al*., 2023), las *Musaceae* (Jaleel *et al*., 2024) y las *Euphorbiaceae* (Abomughaid *et al*., 2024). Un estudio *in vitro* realizado con inóculo ruminal de vacas lecheras y una especie de la familia de las *Fagaceae* indicó que la adición de esta especie reducía la producción de metano hasta en un 40 % con respecto al grupo testigo a medida que aumentaba su concentración (≥50 g kg/d) (Hassanat y Benchaar, 2013). Además, otro estudio de Dagaew *et al*. (2024), en el que se utilizó un 3 % de flor de plátano (familia de las *Musaceae*) en una simulación artificial del rumen bovino, observó una disminución del 14.5 % en la producción de metano ($p \leq 0.05$) en comparación con el grupo testigo, lo que se atribuyó a una reducción de las metanobacterias.

Los metabolitos secundarios presentes en estos herbales influyen directamente en la fermentación ruminal, lo que refuerza la idea de que el efecto depende del perfil fitoquímico específico de cada herbal. Por ejemplo, se ha demostrado que la aplicación de flores de plátano influye en las comunidades microbianas ruminales, lo que da lugar a una reducción significativa de los niveles de metano (CH_4) (mmol/L), atribuible a su contenido en compuestos fenólicos. En este sentido, se observaron reducciones del 10.7 % y del 18.9 % con tasas de inclusión de 30 y 60 g/kg de materia seca (MS), respectivamente, en comparación con el grupo testigo.

Del mismo modo, los extractos de madera de castaño (40 g/día) y de *Acacia spp*. (1.25 % y 2.5 %, caracterizados por su alto contenido en taninos) redujeron significativamente la producción diaria de metano hasta en un 21.6 % (Moscoso *et al*., 2017) y un 33 % (Fagundes *et al*., 2020), respectivamente, en comparación con el grupo testigo. Toda esta información sugiere que la magnitud del efecto observado en los distintos estudios podría estar asociada a la variabilidad del perfil fitoquímico de los recursos vegetales evaluados, su estructura química, su biodisponibilidad dentro de la matriz vegetal y la interacción selectiva que ejercen sobre diferentes grupos microbianos del rumen (metanógenos, protozoos y bacterias competidoras por el H_2). Estas interacciones pueden alterar los patrones de fermentación y explicar parte de la heterogeneidad observada en la respuesta antimetanogénica de la microbiota ruminal ante la adición de metabolitos secundarios de origen vegetal, que varía en función de la especie vegetal, la dosis y las condiciones experimentales.

En conjunto, estos resultados ponen de relieve la importancia de evaluar simultáneamente la dieta basal, el tipo específico de metabolito, la dosis administrada y la fracción vegetal utilizada para desarrollar estrategias nutricionales destinadas a reducir las emisiones de metano en el ganado bovino de carne.

Sesgo de publicación

El sesgo de publicación se refiere a la publicación preferente de resultados positivos estadísticamente significativos, por lo que los estudios sin resultados significativos o con resultados negativos tienen menos probabilidades de ser publicados (Guyatt *et al*., 2011). El sesgo de publicación observado en las variables de respuesta de esta revisión indica una falta de representación precisa de los conocimientos actuales sobre el tema objeto de estudio (Conradi y Joffe, 2017). Aunque el ajuste por sesgo de

publicación en este estudio redujo el número de variables que mostraban un efecto significativo de los metabolitos secundarios, dicho ajuste metodológico reforzó los resultados y el alcance del estudio al identificar que los resultados disponibles diferían sistemáticamente de los resultados que faltaban (Page *et al*., 2020). Esto evita la subestimación o sobreestimación de los efectos del tratamiento observados y reduce el riesgo de sesgo en la toma de decisiones debido a un desequilibrio entre beneficios y riesgos (Lin *et al*., 2018). Otro reto observado en nuestros resultados fue el número limitado de comparaciones entre estudios para determinadas variables. Herbison *et al*. (2011) afirman que hay que ser cautelosos a la hora de extraer conclusiones definitivas a partir de resultados generados con pocas comparaciones. Sin embargo, también mencionaron que unos pocos ensayos son suficientes para obtener una respuesta razonablemente sólida.

CONCLUSIONES

Este metaanálisis demostró que la suplementación con aditivos de origen vegetal ricos en taninos reducía significativamente la producción de metano entérico en el ganado bovino de carne, especialmente cuando las emisiones se expresaban en relación con la ingesta de materia seca (g/kg MS). Los resultados aquí presentados subrayan el potencial de los taninos como estrategia nutricional viable para mejorar la eficiencia de la fermentación, mantener la productividad animal y mitigar el impacto medioambiental de la producción de ganado bovino de carne. Sin embargo, en este estudio deben tenerse en cuenta factores como el tipo de compuesto, la dosis, la composición de la dieta basal, el reducido número de comparaciones y el sesgo de publicación a la hora de evaluar los efectos observados con los taninos, los flavonoides, los terpenos, los terpenoides y los compuestos fenólicos.

Declaración sobre la disponibilidad de los datos

Los datos más relevantes se encuentran en el manuscrito y los archivos de información complementaria, como la base de datos, se encuentran en el repositorio de OSF en https://osf.io/evug9, asignados al proyecto **"**Efecto de los metabolitos secundarios vegetales sobre la producción de metano y los parámetros productivos en el ganado bovino de carne: un metaanálisis**"**.

REFERENCIAS

Aboagye, I.A.; Oba, M.; Castillo, A.R.; Koenig, K.M.; Iwaasa, A.D.; Beauchemin, K.A. Effects of Hydrolyzable Tannin with or without Condensed Tannin on Methane Emissions, Nitrogen Use, and Performance of Beef Cattle Fed a High-Forage Diet. *J. Anim. Sci* **2018**, *96*, 5276-5286.

Aboagye, I.A.; Oba, M.; Koenig, K.M.; Zhao, G.Y.; Beauchemin, K.A. Use of Gallic Acid and Hydrolyzable Tannins to Reduce Methane Emission and Nitrogen Excretion in Beef Cattle Fed a Diet Containing Alfalfa Silage. *J. Anim. Sci* **2019**, *97*, 2230-2244.

Abomughaid, M.M.; Teibo, J.O.; Akinfe, O.A.; Adewolu, A.M.; Teibo, T.K.A.; Afifi, M.; Batiha, G.E.S. A Phytochemical and Pharmacological Review of Ricinus communis L. *Discov. Appl. Sci* **2024**, *6*, 315.

Akanmu, A.M.; Hassen, A.; van Marle-Koster, E.; Adejoro, F.A. Dietary plant extracts reduce methane emission and modulate rumen microbial functionality in Merino lambs. *Sci Rep* **2026**, *16*, doi:10.1038/s41598-026-46933-9.

Alecrim, F.B.; Devincenzi, T.; Reyno, R.; Mederos, A.; Simón Zinno, C.; Mariotta, J.; Ciganda, V.S. Addition of Tannin-Containing Legumes to Native Grasslands: Effects on Enteric Methane Emissions, Nitrogen Losses and Animal Performance of Beef Cattle. *Sustainability* **2024**, *16*, 9135.

Alemu, A.W.; Romero-Perez, A.; Araujo, R.C.; Beauchemin, K.A. Effect of Encapsulated Nitrate and Microencapsulated Blend of Essential Oils on Growth Performance and Methane Emissions from Beef Steers Fed Backgrounding Diets. *Animals (Basel)* **2019**, *9*, 21, doi:10.3390/ani9010021.

Ampapon, T.; Phesatcha, K.; Wanapat, M. Effects of Phytonutrients on Ruminal Fermentation, Digestibility, and Microorganisms in Swamp Buffaloes. *Animals (Basel)* **2019**, *9*, 671, doi:10.3390/ani9090671.

Ampapon, T.; Wanapat, M. Dietary Rambutan Peel Powder as a Rumen Modifier in Beef Cattle. *Asian-Australas. J. Anim. Sci* **2020**, *33*, 763.

Balcells, J.; Aris, A.; Serrano, A.; Seradj, A.R.; Crespo, J.; Devant, M. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *J Anim Sci* **2012**, *90*, 4975-4984, doi:10.2527/jas.2011-4955.

Beauchemin, K.A.; Ungerfeld, E.M.; Eckard, R.J.; Wang, M. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* **2020**, *14*, s2-s16, doi:10.1017/S1751731119003100.

Benetel, G.; Fagundes, G.M.; de Meo-Filho, P.; Silva, T.D.S.; Welter, K.C.; Melo, F.A.; Lobo, A.A.G.; Frighetto, R.T.S.; Berndt, A.; Muir, J.P.; et al. Essential Oils in Nellore Beef Cattle: In Vivo Impact on Rumen Emissions. *Animals (Basel)* **2024**, *14*, 1664, doi:10.3390/ani14111664.

Besharati, M.; Maggiolino, A.; Palangi, V.; Kaya, A.; Jabbar, M.; Eseceli, H.; De Palo, P.; Lorenzo, J.M. Tannin in Ruminant Nutrition: Review. *Molecules* **2022**, *27*, 8273, doi:10.3390/molecules27238273.

Bharanidharan, R.; Xaysana, P.; Hong, W.H.; Kim, T.; Byun, J.S.; Lee, Y.; Tomple, B.M.; Kim, K.H.; Ibidhi, R. Methane emission, nitrogen excretion, and energy partitioning in Hanwoo steers fed a typical TMR diet supplemented with Pharbitis nil seeds. *Front Vet Sci* **2024**, *11*, 1467077, doi:10.3389/fvets.2024.1467077.

Bhatta, R.; Uyeno, Y.; Tajima, K.; Takenaka, A.; Yabumoto, Y.; Nonaka, I.; Enishi, O.; Kurihara, M. Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J Dairy Sci* **2009**, *92*, 5512-5522, doi:10.3168/jds.2008-1441.

Bitsie, B.; Osorio, A.M.; Henry, D.D.; Silva, B.C.; Godoi, L.A.; Supapong, C.; Schoonmaker, J.P. Enteric Methane Emissions, Growth, and Carcass Characteristics of Feedlot Steers Fed a Garlic- and Citrus-Based Feed Additive in Diets with Three Dif-ferent Forage Concentrations. *J. Anim. Sci* **2022**, *100*, skac139.

Caetano, M.; Wilkes, M.J.; Pitchford, W.S.; Lee, S.J.; Hynd, P.I. Effect of Ensiled Crimped Grape Marc on Energy Intake, Performance and Gas Emissions of Beef Cattle. *Anim. Feed Sci. Technol* **2019**, *247*, 166-172.

Cidrini, I.A.; Granja-Salcedo, Y.T.; Prados, L.F.; Kishi, L.T.; Siqueira, G.R.; Resende, F.D. Effect of Tannin Extract Associated with Two Levels of Non-Protein Nitrogen in the Supplement on Performance, Ruminal Parameters, and Microbial Diversity of Grazing Nellore Cattle during the Growing Phase at Dry Season. *Anim. Feed Sci. Technol* **2022**, *286*, 115269.

Coneglian, S.M.; Serrano, R.D.C.; Cruz, O.T.B.; Branco, A.F. Effects of Essential Oils of Cashew and Castor on Intake, Digestibility, Ruminal Fermentation and Purine Derivatives in Beef Cattle Fed High Grain Diets. *Semina Cienc. Agrar. 2019, 40(5), 2057–* **2019**.

Conradi, U.; Joffe, A.R. Publication bias in animal research presented at the 2008 Society of Critical Care Medicine Conference. *BMC Res Notes* **2017**, *10*, 262, doi:10.1186/s13104-017-2574-0.

Cremonesi, P.; Severgnini, M.; Battelli, M.; Monistero, V.; Penati, M.; Gazzonis, A.L.; Addis, M.F. Impact of Increasing Dietary Concentrations of Quebracho Tannins on the Ruminal and Fecal Microbiota of Dairy Goats. **2023**.

Cuervo, W.; Gomez, C.; Tarnonsky, F.; Fernandez-Marenchino, I.; Maderal, A.; Podversich, F.; Vargas, J.J.; DiLorenzo, N. Effect of Cashew Nutshell Extract, Saponins and Tannins Addition on Methane Emissions, Nutrient Digestibility and Feeding Behavior of Beef Steers Receiving a Backgrounding Diet. *Animals (Basel)* **2024**, *14*, 3126, doi:10.3390/ani14213126.

Dagaew, G.; Kunhareang, S.; Phupaboon, S.; Matra, M.; Sommai, S.; Suriyapha, C.; Prachumchai, R.; Wanapat, M. The use of microencapsulated banana flower powder pellet on in vitro ruminal fermentation, digestibility, microbial diversity, and methane production. *Trop Anim Health Prod* **2024**, *56*, 263, doi:10.1007/s11250-024-04101-z.

de Sá Assis, M.C.; Costa, G.R.D.R.; Dias, F.M.C.; da Silva, C.S.; de Lima, J.S.; Torres, T.R.; de Souza, E.J.O. Can Phytogenic Addi-tives Replace Monensin Sodium in Beef Cattle Feeding? Trop. *Anim. Health Prod* **2023**, *55*, 107.

Delgadillo-Ruiz, L.B.-V., R.; Gallegos-Flores, P.; Echavarría-Cháirez, F.; Meza-López, C.; Gaytán-Saldaña, N. Modificación de la fermentación ruminal in vitro para mitigación de metano mediante la adición de aceites esenciales de plantas y compuestos terpenoides. *Abanico Veterinario* **2021**, *11*, doi:10.21929/abavet2021.9.

DerSimonian, R.; Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* **1986**, *7*, 177-188, doi:10.1016/0197-2456(86)90046-2.

Duval, S.; Tweedie, R. Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics* **2000**, *56*, 455-463, doi:10.1111/j.0006-341x.2000.00455.x.

Ebrahim, H.; Negussie, F. Effect of Secondary Compounds on Nutrients Utilization and Productivity of Ruminant Animals: A Review. *J. Agric. Sci. Pract* **2020**, *5*, 60-73.

Egger, M.; Davey Smith, G.; Schneider, M.; Minder, C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* **1997**, *315*, 629-634, doi:10.1136/bmj.315.7109.629.

Espinoza-Velasco, B.; Mella, M.R. Vegetable Tannins, Ruminal Microbiota and Ruminant Metabolism Interaction. *Trop. Subtrop. Agroecosyst* **2021**, *25*.

Fagundes, G.M.; Benetel, G.; Welter, K.C.; Melo, F.A.; Muir, J.P.; Carriero, M.M.; Bueno, I.C. Tannin as a Natural Rumen Modi-fier to Control Methanogenesis in Beef Cattle in Tropical Systems: Friend or Foe to Biogas Energy Production? Res. *Vet. Sci* **2020**, *132*, 88-96.

Ferreira, A.M.; Marques, A.T.; Bhide, M.; Cubric-Curik, V.; Hollung, K.; Knight, C.H.; De Almeida, A.M. Sequence Analysis of Bitter Taste Receptor Gene Repertoires in Different Ruminant Species. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124933.

Fonseca, N.V.B.; da Silva Cardoso, A.; Granja-Salcedo, Y.T.; Siniscalchi, D.; Camargo, K.D.V.; Dornellas, I.A.; Reis, R.A. Effects of Condensed Tannin-Enriched Alternative Energy Feedstuff Supplementation on Performance, Nitrogen Utilization, and Rumen Microbial Diversity in Grazing Beef Cattle. *Livest. Sci* **2024**, *287*, 105529.

González, F.A.; Cosentino, V.R.N.; Loza, C.; Cerón-Cucchi, M.E.; Williams, K.E.; Bualó, R.; Gere, J.I. Inclusion of Lotus tenuis in Beef Cattle Systems in the Argentinian

Flooding Pampa as an Enteric Methane Mitigation Strategy. *N. Z. J. Agric. Res* **2025**, *68*, 648-659.

Guerra, R.N.M.; Oliveira, A.S.; Farias, J.R.; Franco, D.C.G.; Santos, P.G.; Barbosa, N.T.; Nascimento, F.R.F. Anacardiaceae Fami-ly: Effect of Isolated Compounds and Other Identified Phytochemicals Against Clinically Relevant Candida Species—A Short Review. *Antibiotics* **2025**, *14*, 308.

Guyatt, G.H.; Oxman, A.D.; Montori, V.; Vist, G.; Kunz, R.; Brozek, J.; Alonso-Coello, P.; Djulbegovic, B.; Atkins, D.; Falck-Ytter, Y.; et al. GRADE guidelines: 5. Rating the quality of evidence--publication bias. *J Clin Epidemiol* **2011**, *64*, 1277-1282, doi:10.1016/j.jclinepi.2011.01.011.

Hassan, F.U.; Arshad, M.A.; Ebeid, H.M.; Rehman, M.S.U.; Khan, M.S.; Shahid, S.; Yang, C. Phytogenic Additives Can Modulate Rumen Microbiome to Mediate Fermentation Kinetics and Methanogenesis Through Exploiting Diet–Microbe Interaction. *Front. Vet. Sci* **2020**, *7*, 575801.

Hassanat, F.; Benchaar, C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. *J Sci Food Agric* **2013**, *93*, 332-339, doi:10.1002/jsfa.5763.

Hedges, L.V. Distribution Theory for Glass's Estimator of Effect Size and Related Estimators. *J. Educ. Stat* **1981**, *6*, 107-128.

Henderson, G.; Cox, F.; Ganesh, S.; Jonker, A.; Young, W.; Janssen, P.H. Rumen Microbial Community Composition Varies with Diet and Host. *Anim. Microbiome* **2020**, *2*, 1-16.

Herbison, P.; Hay-Smith, J.; Gillespie, W.J. Meta-analyses of small numbers of trials often agree with longer-term results. Journal of Clinical Epidemiology **2011**, *64*, 145-153, doi:10.1016/j.jclinepi.2010.02.017.

Herremans, S.; Decruyenaere, V.; Cantalapiedra-Hijar, G.; Beckers, Y.; Froidmont, E. Effects of hydrolysable tannin-treated grass silage on milk yield and composition, nitrogen partitioning and nitrogen isotopic discrimination in lactating dairy cows. *Animal* **2020**, *14*, 771-779, doi:10.1017/S175173111900226X.

Holik, S.; Malyugina, S.; Staffa, A.; Filipek, J.; Horký, P.; Kadek, R.; Illek, J. Effect of dietary plant tannin supplementation on rumen fermentation and enteric methane production. *Journal of Animal and Feed Sciences* **2025**, *34*, 272-283.

Jadhavar, P.; Deshpande, D.S. Recent Updates on Medicinal Potentiality of Fabaceae Family: Critical Review. *Int. J. Pharm. Sci* **2022**, *13*, B32-41.

Jaleel, A.K.; Jacob, S.; Ghosh, S.M.; Suresh, A. A Comprehensive Review on Nutrient Profile and Pharmacological Benefits of Musa paradisiaca. *Sci. Phytochem* **2024**, *3*, 123-143.

Jayanegara, A.; Goel, G.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. Reduction in Methane Emissions from Ruminants by Plant Secondary Metabolites: Effects of Polyphenols and Saponins. In *In Sustainable Improvement of Animal Production and Health; Odongo, N.E.; Garcia, M.; Viljoen, G.J., Eds*; 2010; pp. 151-157.

Jayanegara, A.; Leiber, F.; Kreuzer, M. Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr* **2011**, *96*, 365-375.

Jimenez-Ocampo, R.; Montoya-Flores, M.D.; Pamanes-Carrasco, G.; Herrera-Torres, E.; Arango, J.; Estarron-Espinosa, M.; Aguilar-Perez, C.F.; Araiza-Rosales, E.E.;

Guerrero-Cervantes, M.; Ku-Vera, J.C. Impact of orange essential oil on enteric methane emissions of heifers fed bermudagrass hay. *Front Vet Sci* **2022**, *9*, 863910, doi:10.3389/fvets.2022.863910.

Joch, M.; Mrázek, J.; Skřivanová, E.; Čermák, L.; Marounek, M. Effects of Pure Plant Secondary Metabolites on Methane Pro-duction, Rumen Fermentation and Rumen Bacteria Populations In vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr* **2018**, *102*, 869-881.

Kabera, J.N.; Semana, E.; Mussa, A.R.; He, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *J. Pharm. Pharmacol* **2014**, *2*, 377-392.

Kamra, D.N.; Pawar, M.; Singh, B. Effect of Plant Secondary Metabolites on Rumen Methanogens and Methane Emissions by Ruminants. In *In Dietary Phytochemicals and Microbes; Springer: Dordrecht, Netherlands*; 2012; pp. 351-370.

Khejornsart, P.; Juntanam, T.; Gunun, P.; Gunun, N.; Cherdthong, A. Effect of High-Tannin and Polyphenol Plant Material Sup-plement on Rumen Fermentation, Nitrogen Partitioning and Nutrient Utilization in Beef Cattle. *Animals* **2024**, *14*, 3092.

Kholif, A.E.; Olafadehan, O.A. Essential Oils and Phytogenic Feed Additives in Ruminant Diet: Chemistry, Ruminal Microbiota and Fermentation, Feed Utilization and Productive Performance. *Phytochem. Rev* **2021**, *20*, 1087-1108.

Koenig, K.M.; Beauchemin, K.A. Effect of Feeding Condensed Tannins in High Protein Finishing Diets Containing Corn Distill-ers Grains on Ruminal Fermentation, Nutrient Digestibility, and Route of Nitrogen Excretion in Beef Cattle. *J. Anim. Sci* **2018**, *96*, 4398-4413.

Kotz, A.; Azevedo, P.A.; Khafipour, E.; Plaizier, J.C. Effects of the Dietary Grain Content on Rumen and Fecal Microbiota of Dairy Cows. *Can. J. Anim. Sci* **2020**, *101*, 274-286.

Króliczewska, B.; Pecka-Kiełb, E.; Bujok, J. Strategies Used to Reduce Methane Emissions from Ruminants: Controversies and Issues. *Agriculture* **2023**, *13*, 602.

Kumari, P.; Singh, P.; Verma, A.K.; Gaur, G.K.; Das, A. Effect of Molasses Based Multi-Nutrient Herbal Supplements on the Performance of Buffalo Calves. *Indian J. Anim. Sci* **2019**, *89*, 871-875.

Ku-Vera, J.C.; Jimenez-Ocampo, R.; Valencia-Salazar, S.S.; Montoya-Flores, M.D.; Molina-Botero, I.C.; Arango, J.; Gomez-Bravo, C.A.; Aguilar-Perez, C.F.; Solorio-Sanchez, F.J. Role of Secondary Plant Metabolites on Enteric Methane Mitigation in Ruminants. *Front Vet Sci* **2020**, *7*, 584, doi:10.3389/fvets.2020.00584.

Lambie, S.C.; Kelly, W.J.; Leahy, S.C.; Li, D.; Reilly, K.; McAllister, T.A.; Valle, E.R.; Attwood, G.T.; Altermann, E. The complete genome sequence of the rumen methanogen Methanosarcina barkeri CM1. *Stand Genomic Sci* **2015**, *10*, 57, doi:10.1186/s40793-015-0038-5.

Lee, S.J.; Lee, Y.J.; Eom, J.S.; Kim, H.S.; Choi, Y.Y.; Jo, S.U.; Kang, S.N.; Park, H.Y.; Kim, D.H.; Lee, S.S. Effects of the Appropriate Addition of Antioxidants from Pinus densiflora and Mentha canadensis Extracts on Methane Emission and Rumen Fermentation. *Animals (Basel)* **2020**, *10*, 1888, doi:10.3390/ani10101888.

Li, W.; Chen, H.; Xu, B.; Wang, Y.; Zhang, C.; Cao, Y.; Xing, X. Research Progress on Classification, Sources and Functions of Dietary Polyphenols for Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *J. Future Foods* **2023**, *3*, 289-305.

Lima, J.; Ingabire, W.; Roehe, R.; Dewhurst, R.J. Estimating Microbial Protein Synthesis in the Rumen-Can 'Omics' Methods Provide New Insights into a Long-Standing Question? *Vet Sci* **2023**, *10*, doi:10.3390/vetsci10120679.

Lin, L.; Aloe, A.M. Evaluation of various estimators for standardized mean difference in meta-analysis. *Stat Med* **2021**, *40*, 403-426, doi:10.1002/sim.8781.

Lin, L.; Chu, H.; Murad, M.H.; Hong, C.; Qu, Z.; Cole, S.R.; Chen, Y. Empirical Comparison of Publication Bias Tests in Meta-Analysis. *Journal of General Internal Medicine* **2018**, *33*, 1260-1267, doi:10.1007/s11606-018-4425-7.

Liu, L.; Wang, P.; Liu, S.; Yan, M.; Zhang, Q.; Clark, E.; Wang, J. Meta-analyses of the global impact of non-antibiotic feed additives on livestock performance and health. *J Adv Res* **2026**, *79*, 1-14, doi:10.1016/j.jare.2025.03.009.

Lopez-Garcia, A.; Saborio-Montero, A.; Gutierrez-Rivas, M.; Atxaerandio, R.; Goiri, I.; Garcia-Rodriguez, A.; Jimenez-Montero, J.A.; Gonzalez, C.; Tamames, J.; Puente-Sanchez, F.; et al. Fungal and ciliate protozoa are the main rumen microbes associated with methane emissions in dairy cattle. *Gigascience* **2022**, *11*, giab088, doi:10.1093/gigascience/giab088.

Loregian, K.E.; Pereira, D.A.; Rigon, F.; Magnani, E.; Marcondes, M.I.; Baumel, E.A.; Paula, E.M. Effect of Tannin Inclusion on the Enhancement of Rumen Undegradable Protein of Different Protein Sources. *Ruminants* **2023**, *3*, 413-424.

Magnani, E.; Silva, T.H.; Sakamoto, L.; Manella, M.Q.; Dias, F.M.; Mercadante, M.E.; Branco, R.H. Tannin-Based Product in Feedlot Diet as a Strategy to Reduce Enteric Methane Emissions of Nellore Cattle Finished under Tropical Conditions. *Transl. Anim. Sci* **2023**, *7*, txad048.

Maroyi, A. Medicinal Uses of the Fabaceae Family in Zimbabwe: A Review. *Plants (Basel)* **2023**, *12*, 1255, doi:10.3390/plants12061255.

Mezzomo, R.; Paulino, P.V.R.; Barbosa, M.M.; Martins, T.S.; Pereira, L.G.R.; Silva, J.C.; Serão, N.V. Protein Dietary Efficiency and Methane Emission in Cattle Fed Soybean Meal Treated with Tannins. *Anim. Prod. Sci* **2018**, *58*, 2233-2241.

Mitchell, J.D.; Pell, S.K.; Bachelier, J.B.; Warschefsky, E.J.; Joyce, E.M.; Canadell, L.C.; Coiffard, C. Neotropical Anacardiaceae (Cashew Family). *Braz. J. Bot* **2022**, *45*, 139-180.

Molina-Botero, I.C.; Montoya-Flores, M.D.; Zavala-Escalante, L.M.; Barahona-Rosales, R.; Arango, J.; Ku-Vera, J.C. Effects of Long-Term Diet Supplementation with Gliricidia sepium Foliage Mixed with Enterolobium cyclocarpum Pods on Enteric Methane, Apparent Digestibility, and Rumen Microbial Population in Crossbred Heifers. *J. Anim. Sci* **2019**, *97*, 1619-1633.

Moscoso M, J.E.; Franco F, F.; San Martín H, F.; Olazábal L, J.; Chino V, L.B.; Pinares-Patiño, C. Methane Production in Grazing Cattle Supplemented with Silage, Concentrate and Tannins in the Peruvian Highlands during the Dry Season. *Rev. Inv. Vet. Perú* **2017**, *28*, : 822-833.

Naumann, H.D.; Tedeschi, L.O.; Zeller, W.E.; Huntley, N.F. The Role of Condensed Tannins in Ruminant Animal Production: Advances, Limitations and Future Directions. *Rev. Bras. Zootec* **2017**, *46*, 929-949.

Norris, A.B.; Crossland, W.L.; Tedeschi, L.O.; Foster, J.L.; Muir, J.P.; Pinchak, W.E.; Fonseca, M.A. Inclusion of quebracho tannin extract in a high-roughage cattle diet alters digestibility, nitrogen balance, and energy partitioning. *J Anim Sci* **2020**, *98*, skaa047, doi:10.1093/jas/skaa047.

Okedoyin, D.O.; Alabi, J.O.; Anotaenwere, C.C.; Wuaku, M.; Gray, D.; Adelusi, O.O.; Anele, U.Y. Metabolomic Profiling, Volatile Fatty Acids, and Greenhouse Gas Emissions of

Beef Cattle Infused with Different Essential Oil Blends. *Ruminants* **2024**, *4*, 329-351.

Orzuna-Orzuna, J.F.; Dorantes-Iturbide, G.; Lara-Bueno, A.; Mendoza-Martínez, G.D.; Miranda-Romero, L.A.; Hernán-dez-García, P.A. Effects of Dietary Tannins' Supplementation on Growth Performance, Rumen Fermentation, and Enteric Methane Emissions in Beef Cattle: A Meta-Analysis. *Sustainability* **2021**, *13*, 7410.

Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D. The PRISMA 2020 Statement: An Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. *PLoS Med* **2021**, *18*, 1-15.

Page, M.J.; Sterne, J.A.C.; Higgins, J.P.T.; Egger, M. Investigating and dealing with publication bias and other reporting biases in meta-analyses of health research: A review. *Research Synthesis Methods* **2020**, *12*, 248-259, doi:10.1002/jrsm.1468.

Pang, R.; Xiao, X.; Mao, T.; Yu, J.; Huang, L.; Xu, W.; Li, Y.; Zhu, W. The molecular mechanism of propionate-regulating gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *Anim Biosci* **2023**, *36*, 1693-1699, doi:10.5713/ab.23.0061.

Patra, A.K.; Saxena, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J Sci Food Agric* **2011**, *91*, 24-37, doi:10.1002/jsfa.4152.

Pena-Bermudez, Y.A.; Vincenzi, R.; Meo-Filho, P.; Sakamoto, L.S.; Lobo, R.; Benetel, G.; Bueno, I.C. Effect of Yerba Mate Extract as Feed Additive on Ruminal Fermentation and Methane Emissions in Beef Cattle. *Animals* **2022**, *12*, 2997.

Perna Junior, F.; Galbiatti Sandoval Nogueira, R.; Ferreira Carvalho, R.; Cuellar Orlandi Cassiano, E.; Mazza Rodrigues, P.H. Use of Tannin Extract as a Strategy to Reduce Methane in Nellore and Holstein Cattle and Its Effect on Intake, Digestibility,

Microbial Efficiency and Ruminal Fermentation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr* **2023**, *107*, 89-102.

Phesatcha, B.; Phesatcha, K.; Wanapat, M. Mitragyna speciosa Korth Leaf Pellet Supplementation on Feed Intake, Nutrient Digestibility, Rumen Fermentation, Microbial Protein Synthesis and Protozoal Population in Thai Native Beef Cattle. *Animals (Basel)* **2022**, *12*, 3238, doi:10.3390/ani12233238.

Phesatcha, B.; Viennasay, B.; Wanapat, M. Potential Use of Flemingia macrophylla as a Protein Source Fodder to Improve Nutri-ents Digestibility and Ruminal Fermentation Efficiency in Beef Cattle. *Anim. Biosci* **2020**, *34*, 613.

Poornachandra, K.T.; Malik, P.K.; Dhali, A.; Kolte, A.P.; Bhatta, R. Effect of Combined Supplementation of Tamarind Seed Husk and Soapnut on Enteric Methane Emission in Crossbred Cattle. *Carbon Manag* **2019**, *10*, 465-475.

Priyashantha, H.; Jayathissa, I.S.; Vidanarachchi, J.K.; Jayarathna, S.; Mapiye, C.; Maggiolino, A.; Ponnampalam, E.N. Phytochemicals in Ruminant Diets: Mechanistic Insights, Product Quality Enhancement, and Pathways to Sustainable Milk and Meat Production-Invited Review. *Animals (Basel)* **2026**, *16*, doi:10.3390/ani16030425.

Rabee, A.E.; Sayed Alahl, A.A.; Lamara, M.; Ishaq, S.L. Fibrolytic Rumen Bacteria of Camel and Sheep and Their Applications in the Bioconversion of Barley Straw to Soluble Sugars for Biofuel Production. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0262304.

Salami, S.A.; Moran, C.A.; Warren, H.E.; Taylor-Pickard, J. A Meta-Analysis of the Effects of Slow-Release Urea Supplementation on the Performance of Beef Cattle. *Animals (Basel)* **2020**, *10*, 657, doi:10.3390/ani10040657.

Selwal, N.; Rahayu, F.; Herwati, A.; Latifah, E.; Suhara, C.; Suastika, I.B.K.; Wani, A.K. Enhancing Secondary Metabolite Produc-tion in Plants: Exploring Traditional and Modern Strategies. *J. Agric. Food Res* **2023**, *14*, 100702.

Serra, V.; Salvatori, G.; Pastorelli, G. Dietary Polyphenol Supplementation in Food Producing Animals: Effects on the Quality of Derived Products. *Animals (Basel)* **2021**, *11*, 401, doi:10.3390/ani11020401.

Shilpa, R.; Lata, S.; Yadav, A.; Sood, A. Chestnut (Castanea spp.): An Overview on Importance and Its Cultivation. *Agriculture Mag* **2023**, *2*, 266-270.

Shinkai, T.; Takizawa, S.; Enishi, O.; Higuchi, K.; Ohmori, H.; Mitsumori, M. Characteristics of Rumen Microbiota and Prevotella Isolates Found in High Propionate and Low Methane-Producing Dairy Cows. *Front. Microbiol* **2024**, *15*, 1404991.

Silva, T.H.; Magnani, E.; De Andrade, J.G.P.; Amâncio, B.R.; Meurer, G.W.; Reolon, H.G.; Branco, R.H. Evaluation of Increasing Levels of Condensed Tannin Extracted from Acacia mearnsii on Performance, Carcass Traits, Meat Quality, Methane Emission, and Health of Finishing Nellore Bulls. *Anim. Feed Sci. Technol* **2024**, *315*, 116046.

Sirohi, S.K.; Pandey, N.; Goel, N.; Singh, B.; Mohini, M.; Pandey, P.; Chaudhry, P.P. Microbial Activity and Ruminal Methanogenesis as Affected by Plant Secondary Metabolites in Different Plant Extracts. *Int. J. Environ. Sci. Eng* **2009**, *1*, 52-58.

Sommai, S.; Wanapat, M.; Suntara, C.; Prachumchai, R.; Cherdthong, A. Supplementation of Alternanthera sissoo pellets on feed digestion, rumen fermentation, and protozoal population in Thai native beef cattle. *Heliyon* **2024**, *10*, e29972, doi:10.1016/j.heliyon.2024.e29972.

Stewart, E.K.; Beauchemin, K.A.; Dai, X.; MacAdam, J.W.; Christensen, R.G.; Villalba, J.J. Effect of Tannin-Containing Hays on Enteric Methane Emissions and Nitrogen Partitioning in Beef Cattle. *J. Anim. Sci* **2019**, *97*, 3286-3299.

Stifkens, A.; Matthews, E.M.; McSweeney, C.S.; Charmley, E. Increasing the Proportion of Leucaena leucocephala in Hay-Fed Beef Steers Reduces Methane Yield. *Anim. Prod. Sci* **2022**, *62*, 622-632.

Storm, E.; Orskov, E.R. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms. *Br J Nutr* **1983**, *50*, 463-470, doi:10.1079/bjn19830114.

Sun, J.; Zhao, G.; Li, M.M. Using Nutritional Strategies to Mitigate Ruminal Methane Emissions from Ruminants. *Front. Agric. Sci. Eng* **2023**, *10*, 390-402.

Tedeschi, L.O.; Muir, J.P.; Naumann, H.D.; Norris, A.B.; Ramirez-Restrepo, C.A.; Mertens-Talcott, S.U. Nutritional Aspects of Ecologically Relevant Phytochemicals in Ruminant Production. *Front Vet Sci* **2021**, *8*, 628445, doi:10.3389/fvets.2021.628445.

Teng, Z.; Liu, S.; Zhang, L.; Zhang, L.; Liu, S.; Fu, T.; Gao, T. Tea Polyphenols Inhibit Methanogenesis and Improve Rumen Epi-thelial Transport in Dairy Cows. *Animals* **2024**, *14*, 2569.

Teobaldo, R.W.; Cardoso, A.D.S.; Brito, T.R.; Leite, R.G.; Romanzini, E.P.; Granja-Salcedo, Y.T.; Reis, R.A. Response of Phytogenic Additives on Enteric Methane Emissions and Animal Performance of Nellore Bulls Raised in Grassland. *Sustainability* **2022**, *14*, 9395.

Toelke, E.D.; Bachelier, J.B.; Lima, E.A.; Galetto, L.; Demarco, D.; Carmello-Guerreiro, S.M. Diversity of Floral Nectary Secre-tions and Structure, and Implications for Their Evolution in Anacardiaceae. *Bot. J. Linn. Soc* **2018**, *187*, 209-231.

Tseu, R.J.; Junior, F.P.; Carvalho, R.F.; Sene, G.A.D.; Tropaldi, C.B.; Peres, A.H.; Rodrigues, P.H.M. Effect of Tannins and Monensin on Rumen Fermentation and Feed Energy Partitioning of Nellore Cows. *Iran. J. Appl. Anim. Sci* **2021**, *11*.

Twaij, B.M.; Hasan, M.N. Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *Int. J. Plant Biol* **2022**, *13*, 4-14.

Ungerfeld, E.M. Metabolic Hydrogen Flows in Rumen Fermentation: Principles and Possibilities of Interventions. *Front Microbiol* **2020**, *11*, 589, doi:10.3389/fmicb.2020.00589.

van Cleef, F.O.; Dubeux Jr, J.C.; Naumann, H.D.; Santos, E.R.; Sollenberger, L.E.; Vendramini, J.M.; DiLorenzo, N. Methane Emissions and δ13C Composition from Beef Steers Consuming Increasing Proportions of Sericea Lespedeza Hay on Bermu-dagrass Hay Diets. *J. Anim. Sci* **2021**, *99*, skab224.

Vazquez-Carrillo, M.F.; Montelongo-Perez, H.D.; Gonzalez-Ronquillo, M.; Castillo-Gallegos, E.; Castelan-Ortega, O.A. Effects of Three Herbs on Methane Emissions from Beef Cattle. *Animals (Basel)* **2020**, *10*, 1671, doi:10.3390/ani10091671.

Viechtbauer, W. Conducting Meta-Analyses in R with the Metafor Package. *J. Stat. Softw* **2010**, *36*, 1-48.

Viechtbauer, W. Conducting Meta-Analyses in R with the metafor Package. *Journal of Statistical Software* **2010**, *36*, 1 - 48, doi:10.18637/jss.v036.i03.

Viennasay, B.; Wanapat, M. Strategic supplementation of Flemingia silage to enhance rumen fermentation efficiency, microbial protein synthesis and methane mitigation in beef cattle. *BMC Vet Res* **2020**, *16*, 480, doi:10.1186/s12917-020-02703-x.

Wanapat, M.; Ampapon, T.; Phesatcha, K.; Kang, S. Effect of Banana Flower Powder on Rumen Fermentation, Synthesis of Microbial Protein and Nutrient Digestibility in Swamp Buffaloes. *Anim. Prod. Sci* **2018**, *59*, 1674-1681.

Wanapat, M.; Viennasay, B.; Matra, M.; Totakul, P.; Phesatcha, B.; Ampapon, T.; Wanapat, S. Supplementation of Fruit Peel Pel-let Containing Phytonutrients to Manipulate Rumen pH, Fermentation Efficiency, Nutrient Digestibility and Microbial Protein Synthesis. *J. Sci. Food Agric* **2021**, *101*, 4543-4550.

Wann, C.; Wanapat, M.; Mapato, C.; Ampapon, T.; Huang, B.Z. Effect of Bamboo Grass (Tiliacora triandra) Pellet Supplementa-tion on Rumen Fermentation Characteristics and Methane Production in Thai Native Beef Cattle. *Asian-Australas. J. Anim. Sci* **2019**, *32*, 1153.

Xiao, D.; Meng, T. Nutritional Value Evaluation and Processing Technology of Feed and Nutrition Regulation Measures for Ruminants. *Animals (Basel)* **2024**, *14*, 3153, doi:10.3390/ani14213153.

Yanza, Y.R.; Fitri, A.; Suwignyo, B.; Hidayatik, N.; Kumalasari, N.R.; Irawan, A.; Jayanegara, A. The Utilisation of Tannin Extract as a Dietary Additive in Ruminant Nutrition: A Meta-Analysis. *Animals* **2021**, *11*, 3317.

Zhang, Q.; Wu, S.; Zou, X.; Ruan, S.; Kholif, A.E.; Hu, L.; Zhou, W. Effects of Neolamarckia cadamba Leaves Extract on Methano-genesis, Microbial Community in the Rumen and Digestibility of Stylo Silage. *J. Clean. Prod* **2022**, *369*, 133338.

CONCLUSIONES GENERALES

La evidencia experimental colectada en este proyecto confirma que el uso de aditivos herbales representa una estrategia efectiva para modular la fermentación ruminal y mejorar el desempeño productivo en rumiantes. Los resultados indican que estos compuestos son capaces de modificar la microbiota ruminal, particularmente reduciendo grupos microbianos asociados a la metanogénesis y al flujo de hidrógeno, lo que sugiere un cambio en el patrón fermentativo hacia rutas más eficientes. Este efecto se refleja en una mejor utilización de la energía y en mejoras en indicadores productivos como la ganancia de peso y la conversión alimenticia.

En términos generales, los metabolitos secundarios actúan como moduladores del ecosistema ruminal, favoreciendo un equilibrio microbiano que reduce pérdidas energéticas y optimiza la eficiencia fermentativa. No obstante, la magnitud de estos efectos depende de factores como la dosis, el tipo de compuesto y la dieta basal, lo que explica la variabilidad observada entre estudios. En este contexto, los aditivos herbales se perfilan como una alternativa nutricional viable y sostenible para mejorar la eficiencia productiva y mitigar el impacto ambiental en sistemas de producción de rumiantes.

MATERIAL COMPLEMENTARIO

1. Cadenas de búsqueda completas para las bases de datos

En la tabla 1 se recogen las fórmulas utilizadas para la búsqueda en las bases de datos (PubMed, Web of Science, Scopus, ScienceDirect, CAB Abstract), los filtros aplicados y el número de artículos encontrados.

Table 1. Search formulas for databases, filters applied, and number of articles found

Databases	Search strategies	Research filter	Number of items
PubMed	((((((((((((((((((((steers) OR (beef cattle)) OR (cattle)) OR (calf)) OR (beef)) AND (terpenoids)) OR (essential oils)) OR (alkaloids)) OR (phenolic compounds)) OR (flavonoids)) OR (tannins)) OR (glycosides)) OR (saponins)) AND (methane)) OR (methane production)) OR (CH4)) AND (in vivo)) NOT (in vitro)) NOT (review)) NOT (meta-analysis)) NOT (humans)) NOT (rats)	Title/Abstract	130
Web of science	TS=(steers OR "beef cattle" OR cattle OR calf OR beef) AND TS=("terpenoids" OR "essential oils" OR "alkaloids" OR "phenolic compounds" OR flavonoids OR tannins OR glycosides OR saponins) AND TS=("methane" OR "methane production" OR CH4) NOT TS=("*in vitro*" OR review OR "meta-analysis" OR humans OR rats) AND LA=(English OR Spanish) AND PY=(2018-2024) AND WC=("Veterinary Sciences" OR "Agriculture" OR "Environmental Sciences")	Title/Abstract	121
Scopus	(steers OR "beef cattle" OR cattle OR calf) AND (terpenoids OR "essential oils" OR alkaloids OR "phenolic compounds" OR flavonoids OR tannins OR glycosides OR saponins) AND (methane OR "methane production" OR ch4) AND NOT ("*in vitro*" OR review OR "meta-analysis" OR humans OR rats)	Title/Abstract	135
Science direct	steers OR (beef cattle, cattle, calf, beef) AND terpenoids OR (essential oils, alkaloids, phenolic compounds, flavonoids, tannins, glycosides, saponins) AND methane OR (methane production, CH4) NOT Systematic review OR (in vitro, in situ, meta-analysis, Humans, Rats)	Title/Abstract and filter of Scientific article	41

Cab abstract	(steer* OR "beef cattle" OR cattle OR calf* OR beef) AND (terpenoid* OR "essential oils" OR alkaloid* OR "phenolic compounds" OR flavonoid* OR tannin* OR glycoside* OR saponin*) AND (methane OR "methane production" OR CH4) NOT (in vitro OR review OR "meta-analysis" OR human* OR rat*)	Title/Abstract and Filter of Journal Article y Open Access Full Text available	151

2. Sesgo de publicación y "Trim and fill"

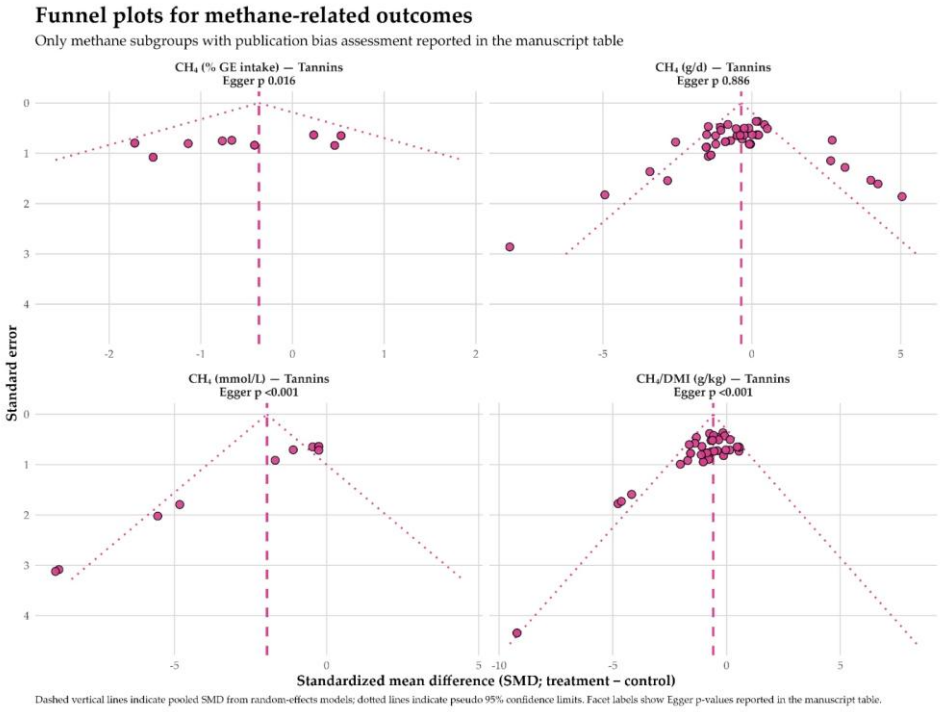

Figure 1. Funnel plots to confirm the presence of publication bias related to methane

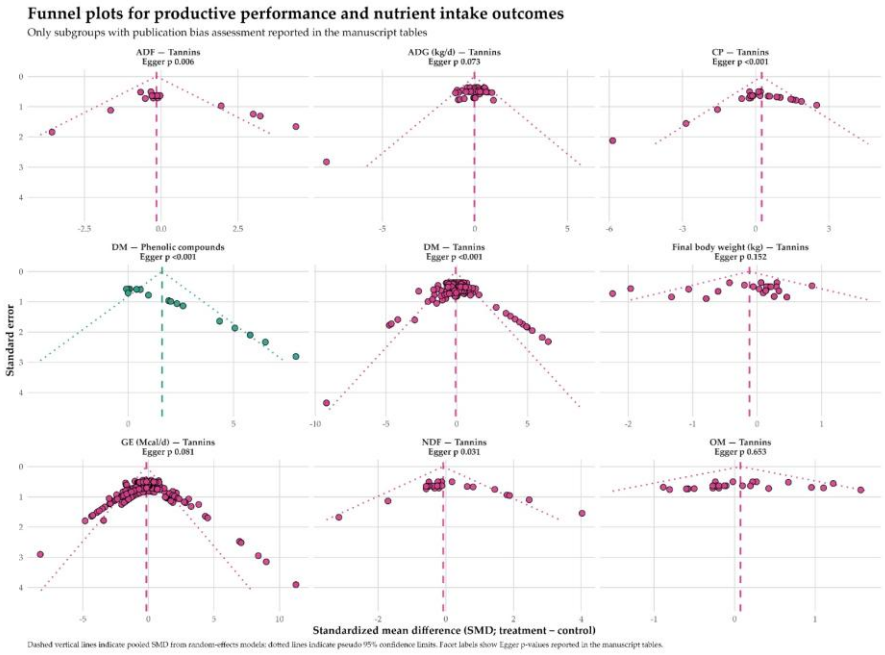

Figure 2. Funnel plots to confirm the presence of publication bias related to production variables

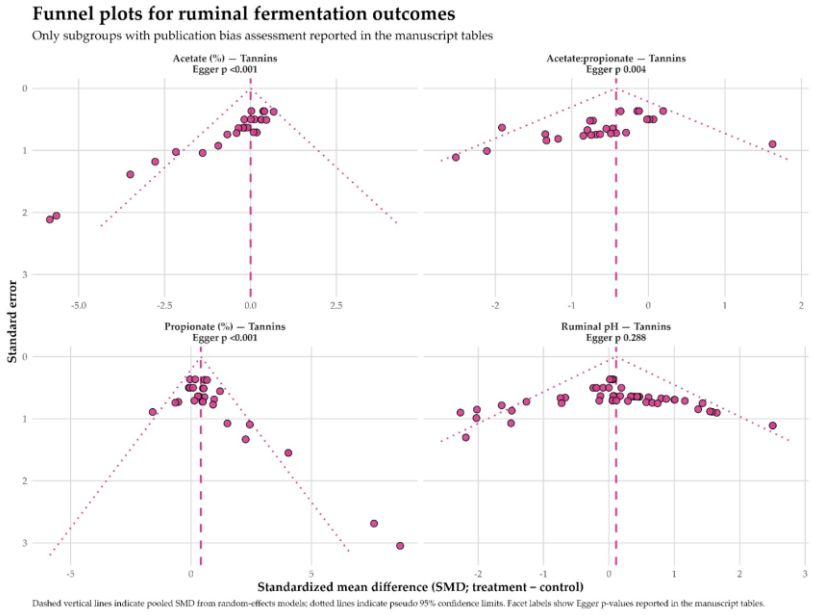

Figure 3. Funnel plots to confirm the presence of publication bias related to fermentation variables

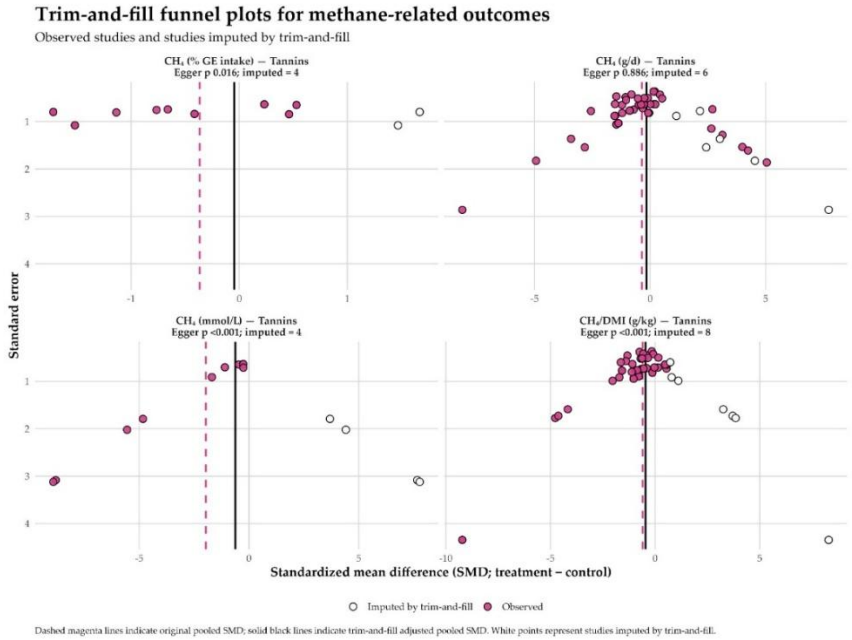

Figure 4. Funnel plots with clipping and filling adjustment to correct for publication bias in methane measurement

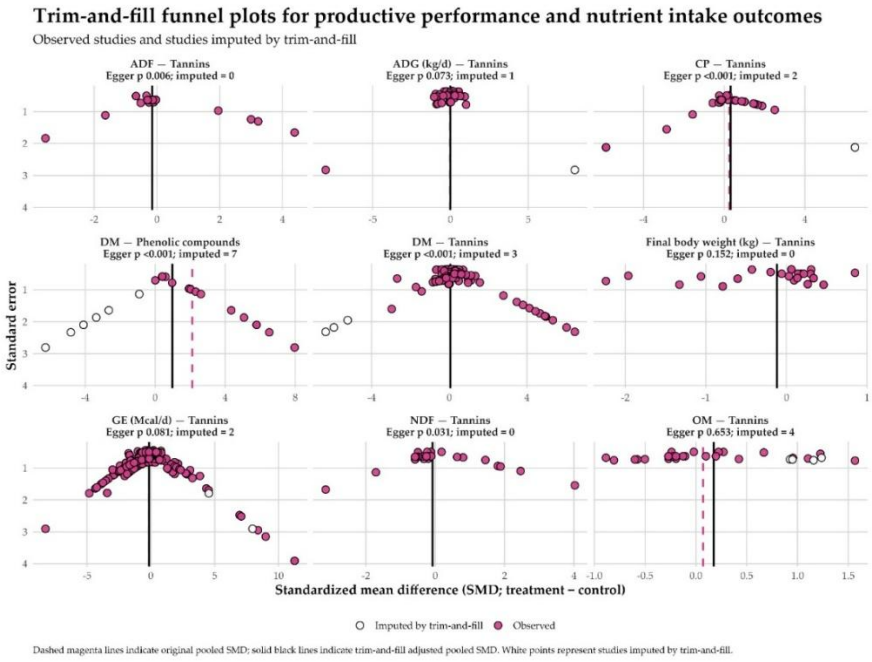

Figure 5. Funnel plots with clipping and filling adjustment to correct for publication bias in production variables

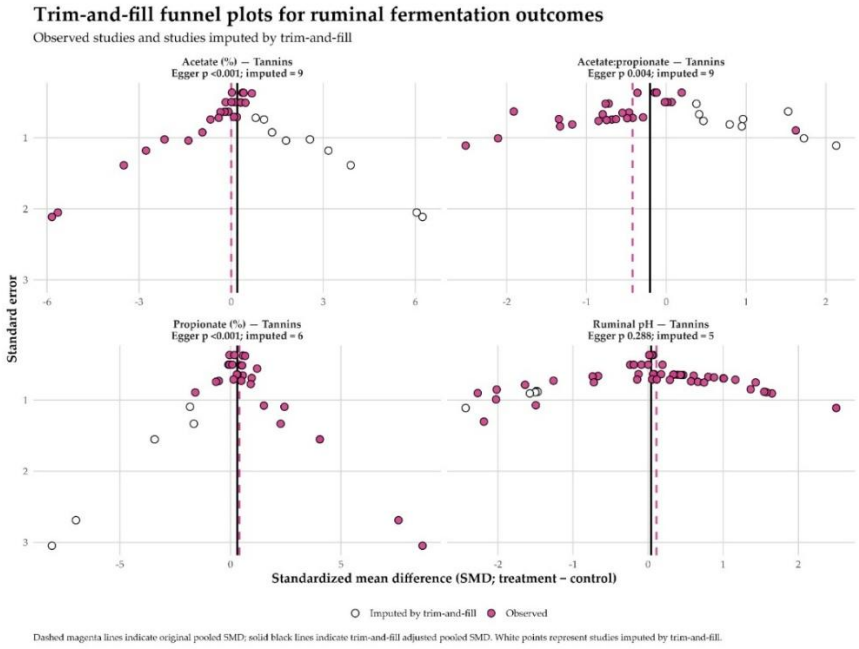

Figure 6. Funnel plots with clipping and filling adjustment to correct for publication bias in fermentation variables