

DESCRIPCIÓN

1. CAMPO DE LA INVENCION

Industria farmacéutica de la medicina veterinaria y zootecnia, alimentos y aditivos para rumiantes. Más en particular, la invención se refiere a un extracto natural que puede ser utilizado como aditivo en formulaciones de dietas y suplementos para la nutrición de rumiantes principalmente ovinos.

2. ARTE PREVIO

Una de las ventajas económicas que tienen los rumiantes para la producción de proteína animal, es que son capaces de alimentarse a base de dietas con altos contenidos de fibra, permitiéndoles aprovechar pasturas ricas en celulosa y hemicelulosa, para la producción de energía y finalmente biosíntesis en carne y leche. Sin embargo, la degradación y digestibilidad de los materiales fibrosos no siempre es eficiente, dada la baja digestibilidad de algunos componentes fibrosos de la dieta y las diferentes interacciones de la flora microbiana que varían en el número de sus poblaciones y las interacciones en el rumen (Krause et al., 2003). Por otro lado, los desafíos que representa el cambio climático en los sistemas de producción de rumiantes debido al impacto de temperaturas altas y bajas precipitaciones que reducen la disponibilidad de pastos y su calidad nutricional, contribuyendo al deterioro de la salud y bienestar de los animales y con esto a en la productividad (Henry et al., 2012). Con el fin de contrarrestar las consecuencias del cambio climático y la pobre calidad nutricional de los forrajes y la salud ruminal, el uso de micronutrientes esenciales y aditivos específicos en rumiantes ha sido implementada alrededor del mundo para mejorar la eficiencia alimenticia, buscando optimizar la producción y sanidad de los animales (McGrath et al., 2018).

En los años cuarenta con el descubrimiento de diversos antibióticos y productos antimicrobianos como promotores del crecimiento animal, el uso de estos se convirtió en una práctica común (García y García, 2015). Los antibióticos especialmente los medicamentos antimicrobianos son utilizados rutinariamente en la industria animal y

actúan modulando la microbiota intestinal la cual resulta beneficioso para la absorción de nutrientes (Henry et al., 2012).

Dentro de este grupo de antibióticos encontramos dos tipos de ionóforos monensina sódica y lasalocida, que en rumiantes son selectivos para la inhibición de algunos microorganismos ruminales, estos, por ejemplo, causan lisis en la pared de las bacterias gram-positivas, previenen enfermedades metabólicas y mejoran la productividad de los animales (Do N Rangel et al., 2008). Estudios realizados con el uso de la monensina en rumiantes, demostraron un ahorro energético de los animales al adicionarla (Richardson et al., 1976). No obstante, en estudios recientes se ha demostrado que el efecto de la monensina también dependerá de la dieta que se proporcione a los animales, en un trabajo realizado por Maas et al. (2001) en el que evaluaron la adición de monensina sódica en dietas para corderos utilizando heno y concentrado, observaron que la adición mayor de monensina mejoraba la eficiencia fermentativa del rumen, sin embargo, la mayor eficiencia fue observada en las dietas con mayor porcentaje de concentrado.

Entre tanto, desde el año 1969 investigadores han informado sobre la posible resistencia bacteriana que genera el uso de estos antibióticos en animales, según reportes de la FAO en el 2005 el uso de antibióticos en el campo de las ciencias veterinarias no tiene mucho control ya que son de venta libre y por ende el uso de estos es indiscriminado, razón por la que se ha generado preocupación en los consumidores, debido a que las personas que ingieren productos de origen animal con residuos generados por el uso de este tipo de aditivos en la dieta, contribuyen a la aparición de microorganismos resistentes o incluso causar enfermedades (Ramírez et al., 2013). Así mismo, la Unión Europea en el año 2006 instauró la prohibición del uso de antibióticos de origen químico como promotores de crecimiento en la alimentación animal (Diario Oficial de la Unión Europea, 2003), y han generado una serie de controversias en países donde aún no se ha prohibido el uso de este tipo de aditivo en la alimentación animal (Wallace et al., 2008). Actualmente a nivel internacional la FAO dirige políticas respaldando la normatividad y pautas sobre inocuidad alimentaria del Codex Alimentarius, el cual ofrece orientación sobre el uso responsable de antimicrobianos en animales productores de alimento, para mitigar el impacto en la salud pública (FAO, 2015), en el 2016 esta misma organización junto a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de

la Salud (OMS), realizó un estudio sobre el progreso en el establecimiento de planes nacionales frente a la resistencia a los antimicrobianos, informando que más de 6500 millones de personas o más del 90 por ciento de la población mundial viven hoy en países que tienen o están desarrollando un plan de acción nacional para abordar la cuestión (FAO, 2017), en abril de 2019 las naciones unidas advirtió a través de un informe realizado por el grupo especial de coordinación interinstitucional sobre la resistencia a los antimicrobianos (IACG) que las enfermedades resistentes a los medicamentos podrían causar 10 millones de muertes anuales para el 2050 (FAO, 2019).

Entre los países participantes de América Latina para el desarrollo de un plan de acción al uso de antimicrobianos, se encuentran Argentina, Brasil, Ecuador, Chile, Perú, Uruguay, Paraguay y Colombia, en Colombia junto a la asociación de infectología y el instituto nacional de salud, establecen actividades de vigilancia y control del uso de productos antimicrobianos en la producción pecuaria controlada por el ICA, entidad reguladora sanitaria en Colombia (MINSALUD, 2018). Por lo tanto, la resistencia de los antibióticos es una de las mayores amenazas a la que se enfrentan la comunidad mundial (FAO, 2019). Por lo anterior y debido a las implicaciones que esto representa, diversos grupos de investigación en todo el mundo han iniciado la búsqueda de alternativas de reemplazo al uso de antimicrobianos en la alimentación animal.

Actualmente el uso de aditivos de origen vegetal ha sido propuesto en la industria de la nutrición animal, ya que los productos naturales tales como extractos naturales, tendrían los mismos o mejores efectos que los antibióticos trayendo consigo una mejor aceptación por parte de los consumidores (Broudiscou et al., 2002), por ejemplo como se describe en la revisión realizada por Zeng et al. (2015) el uso de metabolitos secundarios en la nutrición de cerdos y aves, mejorarían la digestión, absorción de nutrientes, reduciendo los agentes patógenos en el intestino, ejerciendo propiedades antioxidantes y reforzando el sistema inmune de los animales, lo que ayudaría a un mayor rendimiento productivo tanto en cerdos como en aves. De acuerdo Jouany & Morgavi (2007), las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos bioactivos llamados metabolitos secundarios estos metabolitos secundarios tales como taninos, flavonoides y saponinas, anteriormente eran considerados factores antinutricionales debido a efectos negativos

en el consumo de alimento, uso de nutrientes y productividad de los animales. Sin embargo, recientemente estudios *In vivo* e *In vitro* en bovinos, ovinos y cabras han demostrado que la adición de cierta cantidad de estos componentes o metabolitos secundarios en la dieta mejoran notoriamente la fermentación ruminal, cambios en la microbiota ruminal, reduciendo el exceso de degradación de proteínas en la dieta e inducción de la producción de proteínas microbiana (Costa et al., 2017).

Según Patra y Saxena, (2009) a nivel ruminal se ha descrito actividad de algunos metabolitos secundarios. Por ejemplo, los taninos han mostrado tener inhibición de bacterias ruminales, efecto que parece estar relacionado con el peso molecular de estos compuestos que, a mayor peso, menor degradación, como sucede con los taninos condensados que son menos degradados que los taninos hidrolizables por parte de los microorganismos (McAllister et al., 2005). De acuerdo con Kamel, (2001), los extractos vegetales en rumiantes han demostrado que pueden influir positivamente sobre la actividad microbiana del rumen gracias a la acción de metabolitos secundarios entre estos las saponinas, compuestos fenólicos y aceites esenciales, los cuales provocan en el rumen una reducción en la población de bacterias gram positivas y de protozoos, lo que lleva a una reducción de los niveles de amoníaco en el rumen, un aumento de la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y un incremento de la síntesis de proteína microbiana. Igualmente describe Arowolo y He (2018) que el uso de estos extractos como aditivo natural en rumiantes ha mejorado la productividad de los animales, esto gracias a una mayor estabilidad del ambiente ruminal, inhibición del crecimiento de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal, al mejoramiento de la degradación de la fibra y la fermentación y con esto una mayor utilización de nutrientes, aumentando el rendimiento productivo de los animales, es decir mayor producción de carne, leche y lana.

Hablando en términos de patentes se encuentran desarrollos tecnológicos a partir de insumos orgánicos enfocados al tratamiento de parásitos, a la nutrición, bioestimulación o con uso fitosanitarios; un ejemplo se encuentra en la patente MX2012001667 que presenta un extracto de hojas de *Salix babilónica* y *Leucaena leucocephala* en el tratamiento de enfermedades parasitarias en el ganado ovino y la patente

US2017/0251677 que presenta un extracto concentrado de algas, su método de producción y el uso del mismo en la agricultura.

3. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los detalles característicos de esta invención indicada para el mejoramiento de la digestibilidad en animales rumiantes, la preparación del extracto, los ejemplos que se acompañan y la forma de dosificación y uso se sintetizan en la **figura 1**.

Material vegetal. El extracto de la especie *Senna spectabilis* utilizado en la presente invención, se obtiene utilizando exclusivamente las hojas de la planta, las cuales son colectadas 60 días después del corte de la planta.

Obtención del extracto vegetal. 1. El material vegetal se seca a temperatura ambiente bajo sombra removiendo dos veces al día para tener un secado uniforme. **2.** Las hojas se trituran en un molino de martillo con una criba de 1 mm y se empacan en bolsas plásticas de cierre hermético bajo refrigeración para su conservación. **3.** Las hojas se ponen separadamente en frascos de vidrio ámbar para realizar extracción por maceración, utilizando agua como solvente en relación de 10:1 (solvente:material vegetal). **4.** El extracto se obtiene siguiendo una agitación durante 24 horas utilizando un equipo shaker que trabaja a 160 rpm. **5.** Filtración utilizando una bomba de vacío y papel filtro para eliminar grandes partículas. **6.** Liofilización mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida, el proceso se realiza a vacío y a baja temperatura. **7.** Identificación, rotulado y almacenamiento a 5 °C en frascos de vidrio ambar.

En los siguientes ejemplos se presenta la caracterización del extracto, evaluación de del efecto de extractos sobre la fermentación ruminal y digestibilidad in vitro, evaluación del efecto del extracto sobre la digestibilidad in vivo, pH ruminal y la diversidad microbiana ruminal.

Ejemplo 1 - Composición fitoquímica del extracto de *Senna spectabilis*

La identificación de los principales componentes secundarios del extracto se realizó mediante ensayos cualitativos individuales para cada grupo químico, utilizando como guía las técnicas descritas por Murillo & Méndez (2011). Lo anterior mediante reacciones de precipitación y pruebas colorimétricas. Posteriormente se realizó la cuantificación de fenoles totales y fenoles no tánicos por el método de Folin Ciocalteu, el contenido de taninos se estableció mediante la diferencia entre ellos, por el método de Makkar, (2003). La presencia de flavonoides se determinó por el método de cloruro de aluminio descrito por Zhishen et al. (2003).

Como se evidencia en la **tabla 1** se observó en el extracto acuoso de hojas de *Senna spectabilis* carbohidratos totales, saponinas, taninos, flavonoides y cumarinas.

Tabla 1. Caracterización fitoquímica del extracto acuoso de las hojas de la especie <i>Senna spectabilis</i> .			
Metabolito	Prueba	Unidades	Valor
Aminoácidos libres	Ninhidrina	NA	-
Carbohidratos totales	Molisch	NA	+
Proteína		(g E. S B./100 g) ³	7,62
Saponinas	Espuma	NA	+
Fenoles totales	Folin-ciocalteu	NA	+
	Folin-ciocalteu	(g E. A G./100g Extracto) ¹	7,96
Taninos	Cloruro ferrico	NA	+
	Folin-ciocalteu	(g E. A G./100g Extracto) ¹	6,17

Flavonoides	Shidona	NA	+
	Cloruro de aluminio	(g E. Q/100 g) ²	11,38
Alcaloides	Tanred	NA	-
	Mayer	NA	-
	Wagner	NA	-
Cumarinas	Reacción de precipitación y coloración	NA	+
¹ gramos de ácido gálico (GAE)/gramo de extracto acuoso de <i>S. spectabilis</i> , ² gramos de quercetina (QE)/gramo de extracto acuoso de <i>s. spectabilis</i> , ³ gramos de suero bovino (SB)/gramos de extracto acuoso de <i>S. spectabilis</i> . (+, ++, +++) Presencia en aumento.			

Ejemplo 2. Fermentación ruminal y digestibilidad *In vitro* de dietas con diferentes inclusiones de extracto de *Senna spectabilis*.

Para el desarrollo de esta invención se realizó la digestibilidad *In vitro* de dos dietas (100% forraje y 50% forraje + 50% concentrado) con los niveles de inclusión de 5, 10, 20 g/kg de materia seca del extracto de *S.spectabilis*, un tratamiento control (Sin extracto) y un tratamiento control positivo (monensina - Rumensin® 200 -Elanco). Las dietas se incubaron *In vitro* de acuerdo con la metodología Daisy II® (ANKOM Corp, NY). El inóculo fue tomado de un bovino macho con provisto de canula ruminal, el cual fue alimentado con las dietas utilizadas en el estudio para la inclusión de los extractos. Se colectó aproximadamente 1600 ml de líquido ruminal del bovino a través de una manguera, la cual se introducida en el orificio ruminal y con una bomba al vacío se obtenía el líquido ruminal en una garrafa térmica, saturado con CO₂. En cada una las bolsas se depositaron

0,5 g de muestra. Posteriormente estas bolsas se colocaron en jarras a las cuales se les agregara las soluciones tampones A y B, soluciones compuestas por minerales, fuentes de hidrógenos y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso, además del inoculo ruminal y el extracto acuoso con la inclusión a evaluar, fueron introducidas en la incubadora DAISY II® durante 48 h, garantizando una temperatura de 39 °C. Al término de este periodo se agrega 40 ml de HCl al 6 N y 8 g de pepsina (EC 3.4.23.1 Sigma®) dejando las muestras por 24 horas más en la incubadora. Luego de este tiempo las bolsas se secan a 105°C durante 8 h. La (DIVMS) se calcula por la diferencia entre el alimento incubado y el residuo después de la incubación.

El diseño experimental se realizó en bloques completos al azar con arreglo factorial 4x3. Para el análisis estadístico los parámetros de la degradación ruminal *In vitro* fueron estimados utilizando el proceso interactivo Gauss-Newton por medio del procedimiento para modelos no lineales (PROC NLIN) del programa SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1). Las demás variables se analizarán usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.1). Las medias entre los tratamientos fueron comparados utilizando el test de Tukey $\alpha = 0,05$ probabilidad.

Las variables analizadas mostraron que el uso del extracto de *S. spectabilis* mejora la digestibilidad in vitro utilizando una dosis de 20 g / kg de materia seca, tanto en dietas con 100% forraje como en dietas con 50% forraje: 50% concentrado, **Tablas 2 y 3**.

Tabla 2. Degradabilidad (%) y digestibilidad (DIVMS) *In vitro* de la dieta 100% Heno *Dichanthium spp* bajo tres inclusiones diferentes de extractos acuosos del follaje de *Senna spectabilis*.

Degradabilidad	Tratamientos					EEM	P- valor
	T1	T2	T3	T4	T5		
3 hs	16.86 ^a	11.06 ^c	12.48 ^b	12.73 ^b	16.62 ^a	0.31	<0.0001
6 hs	17.87 ^a	14.88 ^{bc}	16.13 ^b	14.25 ^c	18.08 ^a	0.31	<0.0001
12 hs	18.58 ^{ab}	17.19 ^b	17.62 ^b	15.08 ^c	19.25 ^a	0.36	<0.0001
24 hs	27.61 ^b	24.36 ^c	29.52 ^{ab}	28.98 ^{ab}	31.65 ^a	0.76	<0.0001
48 hs	40.62 ^b	35.85 ^c	37.91 ^c	40.84 ^{ab}	43.10 ^a	0.59	<0.0001
72 hs	49.67 ^a	44.10 ^b	50.77 ^a	48.95 ^a	49.56 ^a	0.66	<0.0001
DIVMS %	50.44 ^b	46.87 ^c	33.73 ^e	41.73 ^d	64.56 ^a	0.73	<0.0001

T1: Control; T2: Monensina; T3: 5 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca; T4: 10 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca, T5: 20 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca. EEM: Error estándar de la media. Medias seguidas de letras, en las líneas, difieren por el test de Tukey ($P>0,05$).

Tabla 3. Degradabilidad (%) y digestibilidad (DIVMS) *In vitro* de la dieta 50 % Heno *Dichanthium spp* + 50 % concentrado bajo tres inclusiones diferentes de extractos acuosos del follaje de *Senna spectabilis*.

Degradabilidad	Tratamientos					EEM	P- valor
	T1	T2	T3	T4	T5		
3 hs	23.62 ^a	13.94 ^c	13.20 ^c	17.55 ^b	23.31 ^a	0.48	<0.0001
6 hs	26.46 ^a	18.50 ^c	21.39 ^b	21.42 ^b	25.32 ^a	0.48	<0.0001
12 hs	28.94 ^{ab}	26.48 ^b	30.78 ^a	29.39 ^a	29.59 ^a	0.61	0.0009
24 hs	51.70 ^a	44.25 ^c	47.99 ^b	50.32 ^{ab}	50.92 ^{ab}	0.84	<0.0001
48 hs	65.74 ^b	61.32 ^c	60.85 ^c	64.79 ^b	67.35 ^a	0.38	<0.0001
72 hs	72.67 ^{ab}	69.31 ^c	68.96 ^c	48.95 ^a	69.95 ^{bc}	0.69	0.0001
DIVMS %	75.16 ^b	77.10 ^b	65.13 ^c	68.56 ^c	82.17 ^a	0.91	<0.0001

T1: Control; T2: Monensina; T3: 5 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca; T4: 10 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca, T5: 20 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca. EEM: Error estándar de la media. Medias seguidas de letras, en las líneas, difieren por el test de Tukey ($P>0,05$).

Ejemplo 3: Consumo, Digestibilidad *In Vivo* y Meta-taxonomía microbiana ruminal en Ovinos de Pelo suplementados con extractos naturales de *Senna spectabilis*

Animales y diseño experimental.

Todos los procedimientos experimentales utilizados en este ejemplo se realizaron de acuerdo con las pautas de la Universidad del Tolima (acuerdo del consejo académico número 0171 del 29 de octubre de 2008) y el número 02 de 2017 del comité de bioética. Cuatro corderos criollos castrados (corderos de pelo colombianos) con un peso corporal de 25.15 ± 2.2 kg y una edad promedio de ocho meses se distribuyeron aleatoriamente y se asignaron a uno de los cuatro tratamientos. Cada animal recibió la dieta basal con la adición del aditivo como suplemento. El diseño experimental fue un cuadrado latino 4 x 4 con cuatro tratamientos, cuatro períodos experimentales y un animal para cada tratamiento.

Dietas y tratamientos

La dieta basal estaba compuesta por 50% forraje y 50% concentrado. Como fuente de forraje fue utilizado el ensilaje de maíz y el concentrado fue formulado con las materias primas convencionales (torta de soya, maíz, glicerol, urea, cloruro de sodio, carbonato de calcio, fosfato bicalcico, y premezcla de microminerales y vitaminas (**Tabla 4**). La dieta fue formulada para atender los requerimientos de corderos en crecimiento de acuerdo al NRC (2007).

Los tratamientos experimentales fueron: T1: Control (dieta basal sin aditivos) T2: Monensina (Dieta basal +25 mg de monensina); T3: 10 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca (Dieta basal + 10 g de extracto/kg de MS); T4: 20 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca (Dieta basal + 20 g /kg de MS).

Tabla 4. Ingredientes y composición química de la dieta basal utilizada en los tratamientos experimentales (% de MS)	
Ítem	Proporción
Ingrediente, % de MS	
Ensilaje de Maíz	50.0
Torta de soya	8.05
Maíz	31.50
Glicerol	5.0
Urea	0.20
Cloruro de sodio	0.15
Carbonato de calcio	0.33

Fosfato bicalcico	0.13
Flor de azufre	0.25
Premezcla [†]	0.05
Composición química %	
PC %	12.2
NDT %	75.5
FDN %	42.1
FDA %	18.02
EE %	4.04
Calcio %	0.16
Fosforo %	0.083
Azufre %	0.051
[†] Cobalto 11 mg; Yodo 34 mg; Manganeseo 1.800 mg; Selenio 10 mg; Zinc 2,000 mg; Hierro 1.250 mg; Cobre 120 mg; Vitamina A 37.5 mg; Vitamina D3 0.5 mg; Vitamina E 800 mg.	

Recolección y análisis de muestras.

La digestibilidad *in vivo* se determinó mediante la colección total de heces. Cada período experimental se dividió en dos: 17 días de adaptación a la dieta y cuatro días para la recolección de datos y muestras. Durante el período de adaptación, los animales se colocaron en corrales para cada tratamiento, las raciones para cada animal se ofrecieron fijando un 4% del peso corporal. En el período de recolección, los corderos se alojaron en jaulas metabólicas (1 m de altura x 1 m con x 1,5 m de longitud), equipados con comederos, bebederos y recolectores de heces y orina individuales. Los animales fueron alimentados a las 8:00 a.m. y a las 4:00 p.m., la dieta se ajustó para obtener un 5-10% de sobras. Todas las mañanas antes de la alimentación, se recolectaban y pesaban las heces y las sobras, y las muestras se congelaban para su posterior análisis.

Las muestras de alimentos, sobras y heces se secaron previamente durante 72 horas en una estufa de circulación de aire a 55 °C, se molieron en molinos tipo *Willey* (malla de 2 mm) y se analizaron en el laboratorio de nutrición animal de la Universidad del Tolima. La Materia seca (MS), proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas se determinaron utilizando los métodos descritos por AOAC (2016); la fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente acida (FDA) según Van Soest et al. (1991).

Ingesta y evaluaciones de digestibilidad aparente

Se calculó el consumo de la MS y MO de cada tratamiento por la diferencia entre el total de cada nutriente contenido en el alimento ofrecido a los corderos y la cantidad en las sobras, expresada en gramos por animal por día (g d⁻¹). La digestibilidad de la MS y MO se obtuvo utilizando la ecuación $DA = ((Na - Ns - Nh) / (Nh - Ns)) \times 100$, donde: Na = nutriente en el alimento (g); Ns = nutriente en las sobras (g); y Nh= nutriente en las heces (g).

Estudio meta-taxonómico de la microbiología ruminal

El último día de cada periodo experimental y tres horas de la alimentación de la tarde, fueron colectadas muestras de líquido ruminal directamente del rumen de los animales a través de una cánula. La cánula se abría y se introducía una cuchara espátula para sacar el líquido y contenido ruminal, posteriormente el material tubos cónicos de 50 mL previamente esterilizados. Luego los tubos eran colocados sobre nitrógeno líquido para congelar las muestras a -80°C. Las muestras eran etiquetadas e identificados para cada animal/periodo/tratamiento y posteriormente eran enviadas al laboratorio del Grupo Centro Nacional Secuenciación Genómica de la Universidad de Antioquia. Las muestras de DNA genómico extraídas del contenido ruminal de los animales fueron normalizadas a una concentración de 50 ng/uL. Posteriormente, se prepararon y secuenciaron librerías pareadas de 300 bp de Illumina® en la compañía Macrogen Inc, siguiendo sus recomendaciones (Seoul, Republica de Korea). Las regiones hipervariables V3-V4 del rRNA 16S bacteriano fueron amplificadas usando los primers Bakt 341F (5'- CCTACGGGNGGCWGCAG-3') y Bakt 805R (5'- GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') (Herlemann et al., 2011). Los primers forward y reverse contenían las secuencias de los adaptadores y linkers.

Análisis Bioinformáticos de clasificación taxonómica:

Las lecturas o reads crudos obtenidos del secuenciamiento para las 16 muestras del líquido ruminal, fueron analizadas usando el programa Mothur v1.39 y se siguió el protocolo estándar para librerías de Illumina® Miseq (SOP) de acuerdo a Schloss et al. (2009) y cumpliendo los siguientes pasos: 1. Los reads pareados o paired-end (PE) reads, fueron ensamblados usando la herramienta *make.contigs* del Mothur y

posteriormente alineados a la base de datos de referencia del 16S Silva (Silva.nr v138). 2. Posteriormente se utilizó el algoritmo VSEARCH para remover las secuencias quiméricas. 3. Las secuencias de linajes no bacterianos (Secuencias de origen mitocondrial, cloroplasto, de arqueas y de eucariotas) fueron removidas para los análisis posteriores. 4. Se utilizó la rutina dist.seqs para agrupar los reads en unidades taxonómicas operacionales (Operational taxonomic units-OTUS), considerando una distancia límite entre secuencias del 0.03. 5. Los datos fueron normalizados con el método total group. 6. La clasificación filogenética de los OTUS fue realizada con la herramienta Clasifier de la base de datos del RDP (Ribosomal Database Project-RDP) con un umbral de 80 (80 Bootstrap threshold) (Cole et al., 2014).

Análisis estadístico

Los datos fueron comparados con un ANOVA a un nivel de significancia de $P < 0.05$. Las diferencias entre los tratamientos se analizaron utilizando las pruebas de Duncan con una significancia declarada. El análisis estadístico se realizó utilizando el software SAS (Sistema de Análisis Estadístico, versión 9.1). La diversidad microbiana para cada muestra fue calculada con el paquete Phyloseq del programa R (R v3.6.3). 8. La abundancia relativa en proporciones para las distintas categorías taxonómicas, fue calculada con la función phyloGlom del programa R (R v3.6.3).

El análisis y evaluación del efecto de la adición del extracto de *Senna spectabilis* sobre las variables arrojó los siguientes resultados.

1. Aumento en la digestibilidad de la materia seca y orgánica cuando se incluye 10 g /kg de materia seca de extracto de *S. spectabilis*. **Tabla 5.**
2. Disminución del pH ruminal cuando se incluye 10 g /kg de materia seca. **Tabla 6.**
3. Cambios positivos en la diversidad y abundancia relativa de las bacterias ruminales, especialmente del *Phylum Spirochaetes* y del *Genus Treponema*, lo cual indica un mejoramiento en el proceso digestivo de la fibra. **Tabla 7 y Tabla 8.**

Tabla 5. Consumo y digestibilidad en ovinos de pelo bajo la inclusión de Extractos naturales de *S. spectabilis*.

Variable	tratamientos				EE	P-Valor
	T1	T2	T3	T4		
Consumo (g d ⁻¹)						
MS	1187.8	1149.8	1123.6	1096.5	29.6	0.743
MO	1049.9	1020.0	993.8	972.5	26.7	0.771
Excreción heces (g d ⁻¹)						
MS	352.0 ^a	328.9 ^a	237.0 ^b	284.2 ^{ab}	12.1	0.002
MO	275.1 ^a	272.3 ^a	194.1 ^b	232.3 ^{ab}	10.1	0.008
Digestibilidad aparente (%)						
MS	70.3 ^b	71.1 ^b	78.8 ^a	73.7 ^{ab}	0.88	0.001
MO	73.6 ^b	73.0 ^b	80.4 ^a	75.7 ^{ab}	0.86	0.007

T1: Control; T2: Monensina; T3: 10 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca; T4: 20 g de extracto acuoso de *S spectabilis* por cada kilo de materia seca. EE: error estándar de la media.

Tabla 6. pH ruminal en ovinos de pelo bajo la inclusión de Extractos naturales de *S. spectabilis*.

pH	Hora	Tratamiento				EE	P
		1	2	3	4		
	0	7.01	7.47	6.59	6.78	0.14	0.145
	3	6.60	6.33	6.29	6.32	0.06	0.321
	6	6.78a	6.25b	6.18b	6.26b	0.07	0.003
	12	6.20	6.26	6.20	6.19	0.06	0.980
	24	6.96	6.90	6.74	6.94	0.03	0.053
	Promedio	6.71	6.64	6.45	6.50	0.03	0.090

T1: Control; T2: Monensina; T3: 10 g de extracto acuoso de *S. spectabilis* por cada kilo de materia seca; T4: 20 g de extracto acuoso de *S. spectabilis* por cada kilo de materia seca. EE: error estándar de la media.

Tabla 7. Composición taxonómica a nivel de *Phylum* en muestras de líquido ruminal de ovinos suplementados con extractos naturales de *S. espectabilis*.

<i>Phylum</i>	Tratamiento				EE	P
	1	2	3	4		
<i>Bacteroidetes</i>	59,83	55,37	50,02	62,08	8,35	0,75
<i>Firmicutes</i>	17,93	17,99	16,68	18,61	4,57	0,99
<i>Candidatus_Saccharibacteria</i>	2,35	0,66	1,47	1,10	0,66	0,37
<i>Bacteria_unclassified</i>	2,37	2,00	2,13	2,58	0,57	0,89
<i>Verrucomicrobia</i>	1,06	0,81	0,77	0,43	0,45	0,80
<i>Proteobacteria</i>	14,23	20,99	25,05	11,30	12,19	0,85
<i>Fibrobacteres</i>	0,41	0,87	1,13	0,46	0,34	0,42
<i>Spirochaetes</i>	1,12b	0,52b	1,83a b	2,96 ^a	0,48	0,02
<i>Chloroflexi</i>	0,08	0,05	0,02	0,09	0,03	0,47
<i>Tenericutes</i>	0,08	0,34	0,14	0,07	0,09	0,16
<i>Planctomycetes</i>	0,11	0,08	0,04	0,04	0,03	0,27
Otros	0,42	0,30	0,70	0,29	0,26	0,67

T1: Control; T2: Monensina; T3: 10 g de extracto acuoso de *S. spectabilis* por cada kilo de materia seca; T4: 20 g de extracto acuoso de *S. spectabilis* por cada kilo de materia seca. EE: error estándar de la media.

Tabla 8. Composición taxonómica a nivel de Genero (*Genus*) en muestras de líquido ruminal de ovinos suplementados con extractos naturales de *S. spectabilis*.

Genus	Tratamiento				EE	P
	1	2	3	4		
<i>Prevotella</i>	35,02	33,09	25,33	28,55	6,13	0,68
<i>Bacteroidetes_unclass</i>	12,49	6,58	9,21	13,15	2,40	0,24
<i>Prevotellaceae_unclass</i>	3,33	3,31	3,29	4,24	0,88	0,84
<i>Ruminococcaceae_unclass</i>	7,83	5,44	3,49	5,95	2,21	0,60
<i>C._Saccharibacteria_unclass</i>	2,35	0,66	1,47	1,10	0,66	0,37
<i>Bacteroidales_unclassified</i>	3,82	6,93	5,24	7,54	1,85	0,50
<i>Clostridiales_unclassified</i>	1,98	2,81	1,85	2,40	0,89	0,86
<i>Firmicutes_unclassified</i>	1,74	2,00	1,68	2,13	0,59	0,94
<i>Paraprevotella</i>	1,67a	0,80b	0,93b	1,34ab	0,21	0,04
<i>Lachnospiraceae_unclass</i>	3,58	3,22	3,40	3,23	1,42	1,00
<i>Bacteria_unclass</i>	2,37	2,00	2,13	2,58	0,57	0,89
<i>Succinoclasticum</i>	0,80	1,09	3,24	2,40	0,85	0,21
<i>Porphyromonadaceae_unclass</i>	3,24	4,35	5,72	6,94	2,07	0,62
<i>Verrucomicrobia_unclassified</i>	0,36	0,03	0,37	0,18	0,22	0,64
<i>Erysipelotrichaceae_unclass</i>	0,20	0,94	1,05	0,22	0,53	0,55
<i>Veillonellaceae_unclass</i>	0,30	0,21	0,20	0,44	0,15	0,66
<i>Fibrobacter</i>	0,41	0,87	1,13	0,46	0,34	0,42
<i>Desulfovibrionaceae_unclass</i>	0,09	0,05	0,06	0,04	0,04	0,90

