EFECTOS DE LA Stevia rebaudiana (KA'A HE'E) EN LOS INDICADORES DEL METABOLISMO RUMINAL EN OVINOS ALIMENTADOS CON BALACEADO PARA ENGORDE

EFFECTS OF Stevia rebaudiana (KA'A HE'E) ON THE RUMEN METABOLISM INDICATORS IN SHEEP FED GUNNED FATTENING

Torres M¹, Ortega O¹, Báez, M¹, González A¹, Lara M¹, Sardi S²

¹Departamento de Ciencias Fisiológicas-Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Asunción-San Lorenzo-Paraguay

²Tesista de Grado para optar al título de Doctor en Ciencias Veterinarias- Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Nacional de Asunción-San Lorenzo-Paraguay

RESUMEN. El objetivo fue medir el efecto de la *Stevia rebaudiana* en los indicadores ruminales (pH, recuento de protozoarios, prueba de reductasas) en ovinos provistos de fístula ruminal y alimentados con balanceado de engorde. Para el estudio se utilizaron 3 ovinos, con cánula ruminal confinados en boxes diferentes, sometidos a tratamientos: (TC) 3 animales adaptados a la alimentación con forraje a base de pasto colonial (*Panicum maximun*); (T1) 3 alimentados con concentrado a base de maíz molido y expeler de almendra de coco acompañado de pasto picado; (T2) 3 alimentados con concentrado, pasto colonial, más hojas de *Stevia Rebaudiana* al 1%; y (T3) 3 alimentados con concentrado, pasto colonial, más hojas de *Stevia rebaudiana* al 2%. Las raciones fueron ofrecidas 2 veces al día y las tomas de muestras fueron hechas por la mañana y tarde. Los resultados obtenidos en cuanto al pH en los T1, T2 y T3 demostraron un descenso de sus valores con respecto al TC (p<0,05). En la prueba del azul de metileno, se evidenció que con los tratamientos que presentan concentrados, el tiempo de decoloración de las muestras se acelera (p<0,05) y el recuento de protozoos en los T1, T2 y T3 comparado con el TC también presentó diferencia significativas (p<0,05).

Palabras clave: pH, protozoos, Stevia rebaudiana.

ABSTRACT. The aim was to measure the effect of *Stevia rebaudiana* in rumen indicators in sheep with rumen fistula and fed with balanced. Three sheep were used, with ruminal cannula confined in different boxes. Four treatments were used: (TC) animal adapted to feeding forage base colonial grass (*Panicum maximum*); (T1) based concentrate milled corn kernel and coconut expeller together with chopped grass; (T2) more concentrated *Stevia rebaudiana* leaves 1%; and (T3) more concentrated Stevia rebaudiana leaves 2%. Animal were fed twice days and sample were recollect in the morning and afternoon. The results for pH in T1, T2 and T3 showed a decrease in their values when to compared with TC (p <0.05). Treatment with concentrates displayed accelerates discoloration of the samples with the methylene blue test (p <0.05) and statically significant differences showed a protozoa count in T1, T2 and T3 compared to TC (p<0.05)

Keywords: pH, protozoos, *Stevia rebaudiana*.

doi: http://dx.doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2015.05.02.32-37

Dirección para correspondencia: Prof. Dr. Miguel Torres Ñumbay - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de Asunción - Casilla de Correo N° 1061 - Ruta Mcal. Estigarribia Km 10,5 - Campus Universitario - San Lorenzo - Paraguay **E-Mail:** mtorres@vet.una.py

Recibido: 10 de octubre 2015 / Aceptado: 06 de noviembre de 2015

INTRODUCCIÓN.

La acidosis ruminal es el trastorno digestivo que más afecta a los bovinos lecheros. Numerosos factores influyen en la presentación de esta patología, que van desde el tipo y proporción de componentes de la ración, hasta la temperatura y el agua consumida. Por otra parte, las condiciones retículo-ruminales para el desarrollo de los microorganismos incluyen: aporte de nutrientes, anaerobiosis, pH, presión osmótica, temperatura, fácil acceso de los microorganismos al alimento y eliminación de los productos de desecho de este ecosistema, teniendo en cuenta al bovino como animal de referencia puesto que en ovinos es escasa la información al respecto. La flora normal del rumen se desarrolla en un rango de pH de 5,5 a 6,9. Fuera de éste, el pH extremo favorece el desarrollo de otros microorganismos que alteran el patrón metabólico del rumen y enferman al rumiante (1). La acidosis ruminal es un proceso derivado de la acumulación excesiva de ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen. Esta acumulación puede ser debida a: 1) producción excesiva de AGV, 2) absorción insuficiente de AGV a través de la pared ruminal; 3) aportación (vía salival o por ingestión) insuficiente de sustancias tampones al rumen; y 4) ritmo de paso ruminal excesivamente lento. El control de la acidosis claramente depende de un manejo racional (2).

El Ka'á He'é (Estevia) elimina las bacterias dañinas como Escherichia coli, Salmonella subsp. Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Vibrio parahaemolyticus, Yersinia enterocolitica y no afecta a las bacterias útiles como Lactobacillus y bifidobacterias, lo que indica una acción selectiva. Fukushima Medical University ha revelado que la Stevia tiene una actividad antibacteriana contra el Helicobacter pylori, mientras que Sumika Analysis Center Ltd, ha descubierto la actividad desintoxicante contra la dioxina. También la Osaka Prefectural Institute of Public Health, ha estudiado la actividad del extracto de Estevia en el control de la gripe aviar (in vitro) (3). En un estudio se ha analizado la actividad del rotavirus (HRV) frente a tratamientos realizados con extractos de Estevia rebaudiana, que inhibe la replicación de los cuatro serotipos de HRV in vitro. (4)

Las dulces hojas del Ka'a He'ê contienen compuestos que son derivados de steviolglicósidos de diterpeno (ent-13-hydroxykaur-16-en-19-oic acid). Sus componentes principales son el esteviósido (triglucosylated steviol; 13-0- β -

sophorosyl-19-0- β -glucosyl-steviol) y rebaudiósido-A tetraglucosylated esteviol (; 2'-0- β -glucosil-13- 0 - β -sophorosyl-19 - 0 - β -glucosil-esteviol) (5).

El objetivo general fue evaluar el efecto de la *Stevia rebaudiana* en los indicadores del metabolismo ruminal en animales alimentados con balanceado para engorde y los objetivos específicos fueron determinar el pH ruminal a través de potenciómetro como efecto de la actividad microbiana, caracterizar el perfil reductor del jugo ruminal con la suplementación de *Stevia rebaudiana*, determinar la actividad microbiana por el tiempo de reducción del azul de metileno (TRAM) y cuantificar el número de protozoos mediante la cámara de Neubauer.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue experimental, se utilizaron 3 ovinos adultos con fístula ruminal adaptados a alimentación de forraje durante 21 días entre cada tratamiento condicionado a las características del animal de cría a campo y a los cuales se le extrajo el líquido ruminal para la medición de los siguientes indicadores: el pH (que se midió con el peachímetro portátil), método de potencial de redox (utilizando el azul de metileno al 0.03%) y el recuento de protozoarios en la cámara de Neubauer. Este muestreo se realizó durante 5 días consecutivos en 2 tomas diarias (08:00 h y 15:00 h) y dos repeticiones para cada tratamiento. Los momentos de la toma de muestras responden al criterio de no alterar en demasía el ecosistema ruminal presentando un tenor de fibra bruta de 36 %

Los tratamientos utilizados fueron:

TC: forraje a base de pasto colonial (*Panicum maximun*), este tratamiento fue considerado como testigo. Después de 12 h de haber terminado la serie de toma de muestras del tratamiento testigo, los animales fueron mantenidos en boxes y recibieron el segundo tratamiento.

Para los siguientes tratamientos se utilizó 250 g de concentrado a base de maíz molido y expeler de almendra de coco, acompañado de pasto colonial. A partir del tratamiento 2 se agregaron las hojas de Estevia a diferentes concentraciones.

 $extbf{T1:}$ El concentrado se suministró dos veces al día (07:00 h y 17:00 h) durante 5 días

consecutivos. En el intervalo de dichos momentos se recolectaron muestras del jugo ruminal para la medición de los parámetros.

Terminado este periodo los animales nuevamente fueron alimentados con pasto colonial en el mismo potrero experimental por un término de 21 días. Al término del tratamiento testigo los animales nuevamente se mantuvieron en boxes.

T2: Además de los ingredientes del concentrado se agregó 1 % de hojas de Estevia acompañado de pasto colonial y se procedió con el protocolo establecido.

Se siguió el protocolo anterior de alimentación con forraje por 21 días.

T3: balanceado, pasto colonia, más hojas y ramas de Stevia al 2%.

El líquido ruminal extraído en cada tiempo, tratamiento y animal, se diluyó con agua destilada en una proporción de 50% líquido ruminal y 50% agua destilada. Los valores de referencia del pH ruminal normal para ración de forrajes va de 6.0 - 7.0 y 5.6 - 6.5 para raciones de concentrados. Valores con pH 5.5 se considera una acidosis y un pH de 7.0 - 7.5 una alcalosis ruminal. En la cámara de Neubauer con el microscopio óptico utilizando objetivo de 10x se realizó el conteo de los protozoos por campo. Para éste se tuvo en cuenta el valor de referencia según la cantidad por campo microscópico, basándose en la siguiente escala de valores que se multiplicaban por 10 posteriormente:

•Poca cantidad: 1-5 protozoarios por campo

•Cantidad moderada: 6-10 protozoarios por campo

·Alta cantidad: > 11 protozoarios por campo

Para evaluar la presencia de protozoarios se realizaron los siguientes pasos: se utilizaron gasas y se filtró el líquido ruminal, luego se colocó el mismo sobre un portaobjetos utilizando una varilla de vidrio. Se observó al microscopio con una platina térmica en 10x. Con relación al método de tiempo de reducción de azul de metileno (TRAM) o potencial redox, se incubó 5 mL de jugo ruminal a 37° C con 0,5 mL de azul de metileno al 0,03%. La lectura se realizó hasta los 3 min, considerándose muy bueno la recuperación del color natural del jugo ruminal mezclado con el azul de metileno al término de éste tiempo, bueno hasta los 6 min y malo más de 6 min. Un TRAM prolongado es proporcional al grado de

actividad microbiana que se corresponde a la acidosis ruminal.

Los datos fueron sometidos a estadística inferencial, aplicando el paquete estadístico Infostat. A su vez se analizaron si existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de las variables entre los días muestreados utilizando ANOVA para el pH y la prueba de Chi-cuadrado para el potencial redox y el recuento de protozoarios.

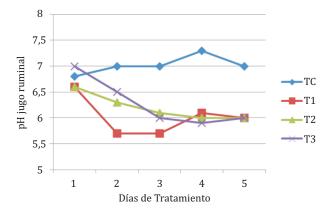
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En el estudio se analizaron parámetros de los indicadores del metabolismo ruminal tras la administración de cuatro tipos de tratamientos en 3 ovinos fistulizados adaptados a la alimentación con forraje. Los indicadores considerados fueron: pH, recuento de protozoos y potencial redox del jugo ruminal. Se pudo observar que cuando los animales eran sometidos con el TC presentaron valores de pH mayor en comparación con los demás tratamientos (T1, T2 y T3). Además en el T1 se aprecia un descenso abrupto del pH hasta los días 2 y 3 para luego mantenerse estable; y en los T2 y T3 aunque se observa un descenso del pH, esta variable se mantuvo sostenida en el tiempo de evaluación (Tabla 1, Figura 1)

Tabla 1: Valores de pH del jugo ruminal de los ovinos tratados.

Tratamiento pH Ruminal Media <u>+</u> DI		
Valores de referencia	6.2 - 7*	
TC	(B) 7,05 <u>+</u> 0,23	
T1	(A) 6,04 <u>+</u> 0,5	
T2	(A) 6,21 <u>+</u> 0,6	
Т3	6,02 <u>+</u> 0,55	
Estadístico ANOVA (F)	F= 4,02 p=0,0001	

Test de Tukey. Medias con una letra distinta no son significativamente diferentes (p < 0,05) * (Kraft, W.; Durr, U., 2000)



La marcada diferencia en el resultado del T1 con respecto al TC puede deberse a los cambios súbitos de alimentos fibrosos a concentrados, ya que con éstos las bacterias amilolíticas, aumentan rápidamente tanto en su número como la tasa general de fermentación, produciendo una acumulación rápida de AGV y de ácido láctico. Esto lleva a bajar el pH ruminal, el cual en principio es óptimo para las bacterias amilolíticas, pero será demasiado bajo para ambos tipos de bacterias, tanto amilolíticas y celulolíticas a medida que progresa el descenso del pH del jugo ruminal. (6)

En la acidosis, la producción de AGV se ve fuertemente aumentada por el rápido crecimiento de bacterias amilolíticas que, como el *Streptococcus bovis*, degradan rápidamente el almidón de los granos. A medida que el pH disminuye la flora

ruminal se va transformando, desapareciendo progresivamente aquellos grupos bacterianos que cumplen funciones con valores de pH elevados, como ser las bacterias que degradan la fibra (Sienra, 2009). En referencia a los tratamientos con Estevia, su efecto sobre la microflora demuestra una tendencia a la homogeneidad del comportamiento de pH. Landázuri y Tigrero (2009), explicaron que la Estevia optimiza la utilidad de los microbios en el rumen, promueve la digestión, incrementa el apetito del animal y acelera el crecimiento en concordancia con el pH estable.

Con el fin de analizar el comportamiento de los protozoos con respecto a cada tratamiento se realizó una contabilización de los mismos y se analizaron obteniendo los siguientes resultados como se observan en la tabla y gráfico 2

Tabla 2. Número de protozoos en el líquido ruminal.

Tratamiento	Numero de Protozoos Media <u>+DE</u>	cv	Min-Max
Valores de Referencia			10-10 ⁴ /mL*
TC	(B)796.500 <u>+</u> 94350	11,85	620.000 - 972.000
T1	(A)1.487866 <u>+</u> 66455	4,47	1.320.000 - 1.587.000
T2	(A)1.186700 <u>+</u> 63357	5,34	1.100.000 - 1.352.000
Т3	(A)1.233.166 <u>+</u> 85400	6,93	1.100.000 - 1.560.000
Estadístico ANOVA (F)	F=4,02 P=0,0001		

Test de Tukey. Medias con una letra distinta no son significativamente diferentes (p < 0,05) *(Kraft, W.; Durr, U., 2000)

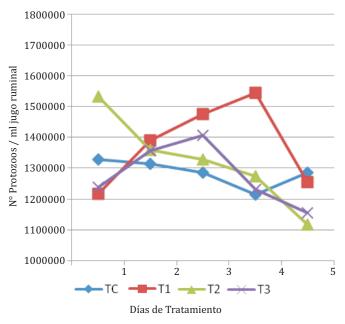


Figura 2. Perfil de números de protozoos en líquido ruminal en días

Teniendo en cuenta el TC y contrastando con los resultados del T1, T2 y T3, éstos presentan diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). En el T1, se evidenció un aumento en el número de protozoos en comparación con los TC, T2 y T3 sin variaciones importantes en los diferentes días del tratamiento. Esto coincide con lo reportado por Reece, 2009; los protozoos aumentan linealmente con el contenido de concentrados de la dieta.

En los resultados de la prueba de azul de metileno, se observó que en el tratamiento control, el 37,5 % de las tomas mostró un tiempo de de coloración aumentado que fue calificado de malo. A partir del tratamiento 1 el 96% de las muestras se mantuvieron en el rango de tiempo considerado bueno, en tanto los T2 y T3 la totalidad de las muestras se consideraron buenas..

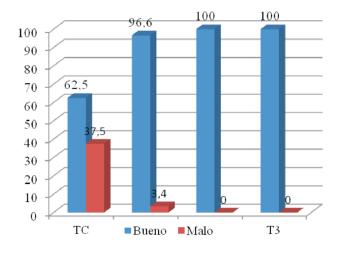


Figura 3. Proporción de reducción de azul de metileno.

Estos datos fueron sometidos al estadístico de chi cuadrado para variables cualitativas, dicha prueba demostró que existen diferencias significativas (p<0,05) entre TC vs. T1; (8,2); TC vs. T2 (10,9) y TC vs. T3 (10,9). Los valores hallados respecto a la actividad reductasa del líquido ruminal coinciden con lo indicado por Bouda y col, 1997, quien administró dietas moderadamente ricas en concentrados y encontró una actividad reductiva con medias de 4,5 ± 2,3 min, rango de tiempo considerado bueno. Como lo indica Kraft, 2000, la velocidad con que se decolora el azul de metileno, depende del número de microorganismos con actividad reductasa y generadoras de AGV;; es decir que a mayor número de bacterias reductoras menor es el tiempo de cambio de color en el tubo.

CONCLUSIÓN.

En cuanto al pH, los tratamientos 1, 2 y 3 denotan un descenso de sus valores con respecto al TC. En lo que respecta al T1, dicho descenso es más precipitado, lo que podría inducir a una acidosis aguda. Esto es propio del cambio de ración y que frecuentemente se observa en animales sometidos a régimen de cebamiento. Sin embargo, en los tratamientos conteniendo Estevia la declinación de pH fue ligero y continuo. Esto constituye un atenuante respecto a los problemas que sobreviene en la acidosis ruminal.

En la de prueba de azul de metileno, se evidenció que con la ración de concentrados el tiempo de decoloración de las muestras se aceleró. Esto fue debido a la alta actividad reductasa del jugo ruminal y producto de la proliferación microbiana. Este último se constató con la marcada diferencia en el recuento de protozoos de los T1, T2 y T3 respecto

al testigo y es un indicador indirecto del estado de la población bacteriana.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Bach A. Trastornos ruminales en el vacuno lechero: un enfoque práctico [Internet]. Barcelona, España: Grupo Asís Biomedia; 2005. [acceso 7 de abril de 2014]. Disponible en www.albeitar.portalveterinaria.com/183p.
- 2. Nagaraja T, Lechtenberg KT. Acidosis en ganado bovino en corral de engorda [Internet]. Manhattan, Estados Unidos: Elsevier. [acceso 6 de agosto de 2013]; 2007. D i s p o n i b l e e n http://www.corraldeengorda.com.mx/download/acidosis in feedlot_cattle, trad.pdf
- 3.Casaccia J, Álvarez E. Recomendaciones técnicas para una producción sustentable del ka'a he'e (Stevia rebaudiana Bertoni) en el Paraguay. Caacupé, Paraguay: DIA-MAG; 2006.
- 4.Takahashi K, Matsuda M, Ohashi K, Taniquchi K, Nakaqomi O, Abe Y [et al.]. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from Stevia rebaudiana. Antiviral Res. [revista en Internet] 2001 Jan. [acceso 6 de agosto de 2013]. 49 (1): 15-2. Disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11166857
- 5. Carro D, Saro, C. Perspectivas y retos de los extractos vegetales como aditivos alimentarios en rumiantes. Barcelona, España: PV ALBEITAR; 2014.
- 6. Reece W. Fisiología de los animales domésticos. Zaragoza, España: Acribia; 2009.
- 7. Sienra R. 2009. Acidosis en bovinos (Internet) Montevideo, Uruguay. [acceso el 9 de agosto de 2013]. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad intoxicaciones metabolicos/metabolicas/bovinos/36-acidosis.pdf
- 8. Landázuri A, Tigrero S. Steviarebaudiana Bertoni, una planta medicinal. [Internet]. Sangolquí, Ecuador: [s.n.]; 2009. [acceso 12 de agosto de 2013]. Disponible en http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3521/1/B-ESPE-000801.pdf
- 9. Bouda J, Paasch M, Yabuta O. Desarrollo y empleo del método de diagnóstico preventivo de los trastornos ruminales y metabólicos en bovinos. Vet Mex (México). 1997; 28: 189-195.

Torres M. y col.

10. Kraft W, Durr U. Diagnóstico de laboratorio clínico en veterinaria. 4^a ed. Zaragoza: Edimsa; 2000.