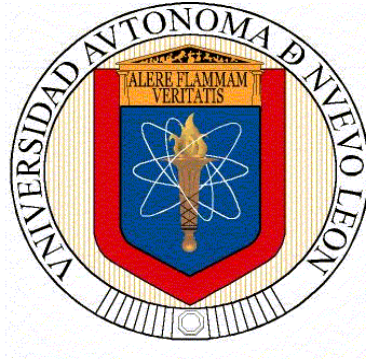


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFFECTO DE MONENSINA SÓDICA, ACEITES ESENCIALES,
TANINOS Y NANOPARTÍCULAS DE ZINC COMO MODIFICADORES
DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro* Y SUS PROPIEDADES
REDUCTORAS DE EMISIONES DE METANO.**

POR
EMMANUEL DÍAZ HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

OCTUBRE, 2020.

EFFECTO DE MONENSINA SÓDICA, ACEITES ESENCIALES, TANINOS Y
NANOPARTÍCULAS DE ZINC COMO MODIFICADORES DE LA
FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro* Y SUS PROPIEDADES
REDUCTORAS DE EMISIONES DE METANO.

Dirección de Tesis



Dr. Jorge R. Kawas Garza
Director



Dr. Héctor Fimbres Durazo
Co-Director



M.C. Nelson Manzanares Miranda
Co-Director



Dr. Gustavo Moreno Degollado
Co-Director



Dr. Gerardo Mendez Zamora
Co-Director

EFFECTO DE MONENSINA SÓDICA, ACEITES ESENCIALES, TANINOS Y
NANOPARTÍCULAS DE ZINC COMO MODIFICADORES DE LA
FERMENTACIÓN RUMINAL *in vitro* Y SUS PROPIEDADES
REDUCTORAS DE EMISIONES DE METANO.

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Vocal

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A la dirección y al personal académico y administrativo del Posgrado Conjunto Agronomía – Veterinaria por el apoyo brindado en cada uno de los momentos durante esta formación profesional.

Al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Dra. Daniela Rico, Tec. Lab. Julia Arteaga y el resto del equipo de trabajo, personal de ayudantías y servicio social por las atenciones, apoyo y por hacerme sentir parte de la familia. ¡Gracias!

Al Centro de Exposiciones Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León, MVZ. Valeria Treviño y a su equipo de trabajo por permitir y apoyar en la estancia de los animales utilizados durante la investigación.

A mi director de tesis, el PhD. Jorge R. Kawas Garza, por compartir su tiempo, entusiasmo y conocimientos y por todo el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al resto de mi comité de tesis, por cada una de sus observaciones y sugerencias brindadas para la elaboración y mejora de este trabajo. Espero se encuentren tan satisfechos como yo por el producto final.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la empresa MNA de México S.A. de C.V y a todos y cada uno de su personal, por el apoyo brindado en todo momento a lo largo del proyecto.

A todos y cada uno de mis compañeros por el apoyo y motivación durante todo el transcurso de nuestra formación no es necesario dar sus nombres y apellidos pues ellos lo saben que más que compañeros ahora somos grandes amigos.

DEDICATORIAS

A mi padre,

José Luis Díaz Puga (†) con todo mi amor, cariño y respeto, a quien siempre me apoyó y me motivó para llegar hasta aquí, la meta y sueño que un día nos fijamos juntos. Dedicada especialmente a ti, que desde el cielo me ves solo te puedo decir. ¡Lo logramos!

A mi madre,

Flor Estela Hernández Gaona con todo mi amor y cariño por apoyarme siempre a cumplir mis sueños, y ser ejemplo de trabajo, dedicación y sacrificio, valores que agradezco infinitamente me inculcara y que fueron fundamentales para mi formación en todos los aspectos.

A mis hermanos,

Luis Alexander y Eder Jaziel, por todo lo que hemos vivido juntos, y por estar siempre para apoyarme y motivarme a seguir con mis metas.

A mis primos,

Juan Vázquez y Daniela Reyes porque me han hecho sentir su incondicional apoyo por sus palabras de motivación y su impulso para seguir adelante.

A todas aquellas personas, familiares, amigos y compañeros por su motivación y presencia a lo largo de este camino.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AGV's. Ácidos grasos volátiles	Mw. Peso Molar
AE. Aceites esenciales	mts. Metros
CON. Control	CH₄. Metano
CLO. Clavo de olor	CO₂. Dióxido de carbono
MON. Monensina sódica	μL. Microlitros
MSP. Metabolitos secundarios de las plantas	mL. Mililitros
OMS. Organización mundial de la salud	mg. Miligramos
®. Marca registrada	H₂. Hidrógeno
%. Porcentaje	nZnO. Nanopartículas de óxido de zinc
g/d. Gramos por día	μg/g. Microgramos por gramo
N. Sodio	P. Valué
K. Potasio	<. Menor que
Ca. Calcio	≤. Menor o igual que
μm. Micrómetro	Mg/día. Miligramos por día
nm. Nanómetros	Mg/L. Miligramos por litro
ZnNPs. Nanopartículas de zinc	mm. Milímetros
mg/kg. Miligramos por kilogramo	g/L. Gramos por litro
ppm. Partes por millón	FID. Detector de ionización de flama
TAN. Taninos	g. Gravedades
°C. Grados centígrados	TM. Marca comercial
Kg/Ton. Kilogramos por tonelada	EB. Etil butírico
	MS. Materia seca

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	V
RESUMEN	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
- 2.1 Fermentación ruminal.....	4
- 2.2 Ácidos grasos volátiles, pH y gas metano.....	4
- 2.3 Modificación de la fermentación ruminal.....	5
- 2.4 Monensina sódica.....	6
- 2.5 Efecto de la monensina sobre las emisiones de metano.....	6
- 2.6 Efecto de la monensina sobre la producción de AGV.....	7
- 2.7 Efecto de la monensina sobre el pH ruminal.....	7
- 2.8 Aceites esenciales.....	8
- 2.9 Efecto de los aceites esenciales sobre las emisiones de metano.....	8
- 2.10 Efecto de los aceites esenciales sobre la producción de AGV.....	9
- 2.11 Efecto de los aceites esenciales sobre el pH ruminal.....	9
- 2.12 Nanopartículas de zinc.....	10
- 2.13 Efecto de las nanopartículas de zinc sobre las emisiones de metano.....	10
- 2.14 Efecto de las nanopartículas de zinc sobre la producción de AGV.....	10
- 2.15 Efecto de las nanopartículas de zinc sobre el pH ruminal.....	11
- 2.16 Taninos	11
- 2.17 Efecto de los taninos sobre las emisiones de metano.....	11
- 2.18 Efecto de los taninos sobre la producción de AGV.....	11
- 2.19 Efecto de los aceites esenciales sobre el pH ruminal.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	15
- 5.1 Objetivo general	15
- 5.2 Objetivos específicos.....	15

6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
- 6.1 Grupos experimentales	16
- 6.2 Obtención del líquido ruminal	16
- 6.3 Producción de gas	17
- 6.4 Determinación de metano	18
- 6.5 Determinación de AGV's y pH	19
- 6.6 Análisis de datos	20
7. RESULTADOS	21
- 7.1 Efecto sobre el valor pH.....	22
- 7.2 Producción de ácidos grasos volátiles.....	23
- 7.3 Producción de gas y emisiones de metano.....	24
8. DISCUSIÓN	25
-8.1 Monensina sódica.....	25
-8.2 Aceites esenciales.....	26
-8.3 Taninos.....	27
-8.4 Nanopartículas de Zinc.....	28
9. CONCLUSIONES	29
10. BIBLIOGRAFÍA	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Efecto de cinco componentes de aceites esenciales sobre el pH ruminal.....	9
Tabla 2: Efecto de dos niveles de taninos contenidos en <i>Lotus corniculatus L</i> sobre el pH ruminal.....	12
Tabla 3: Dieta de adaptación.....	17
Tabla 4: AGV estándar.....	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico de niveles medios de pH iniciales y finales por tratamiento.....	21
Figura 2: Gráfico de producción de AGV (Mmoles) a 24 horas de fermentación.....	22
Figura 3: Gráfico de producción de gas (Psi) a distintos tiempos de fermentación.....	24

RESUMEN

Los sistemas de producción de carne deben ser cada día más rentables debido a la alta demanda que existe de la misma para consumo humano. Cada día se están buscando alternativas que permitan aumentar dicha producción, una estrategia para lograr estos objetivos es la utilización de aditivos no nutritivos, como los ionóforos, siendo la monensina sódica el más comúnmente utilizado. Estos aditivos modifican la fermentación ruminal del animal para lograr una mayor producción y aprovechamiento de nutrientes que permitan tener sistemas más eficientes, sin embargo, en algunas partes del mundo existen restricciones al uso de este tipo de aditivos, por lo que recientemente se inició con la búsqueda de alternativas que permitan sustituir o reducir el uso de estos. Entre las alternativas comúnmente evaluadas se encuentran los metabolitos secundarios de las plantas, principalmente taninos y aceites esenciales, los cuales han demostrado tener efectos similares a la monensina sódica, así como las nanopartículas de zinc que, debido a sus propiedades de tamaño y estabilidad, pueden ser alternativas viables. En el presente estudio se evaluaron 5 tratamientos en un estudio *in vitro*: (1) control; (2) monensina sódica; (3) aceites esenciales (Crina); (4) taninos; y (5) nanopartículas de zinc. Los anteriores tratamientos fueron utilizados como aditivos para determinar su efecto como modificadores de la fermentación ruminal, tomando como indicadores, pH, producción de ácidos grasos volátiles (AGV), producción de gas total y emisiones de metano. Entre los resultados obtenidos se puede destacar que los aceites esenciales mostraron un comportamiento similar a la monensina sódica, manteniendo el valor del pH y mostrando valores similares en la producción de AGV, a excepción del ácido acético, donde existió una disminución significativa, además de una mayor producción de gas total. En cuanto a los taninos y nanopartículas de zinc (ZnNPs), estos disminuyeron la producción de AGV y aumentaron la producción de gas total, siendo únicamente las ZnNPs las que aumentaron el valor de pH al final de la fermentación. Dichos resultados sugieren que los aceites esenciales muestran potencial para seguir siendo evaluados como aditivo no-nutritivo, así como alternativa al uso de la monensina sódica.

ABSTRACT

Meat production systems must become more efficient in order to satisfy the increasing demand of meat for human consumption. Continuously new alternatives are being sought to replace non-nutritive additives such as the ionophores, being monensin sodium the most used in feedlot diets. Monensin modifies rumen fermentation improving energy utilization. However, in some countries there are restrictions on the use of these types of antimicrobial additives, which is why alternatives to substitute them are being evaluated. Among the alternatives commonly evaluated are plant secondary metabolites, mainly tannins and essential oils, which have been shown to have similar effects to monensin sodium. Also, zinc nanoparticles are being studied due to their properties in terms of size and stability. In the present study, five treatments were evaluated in an *in vitro* study: (1) control; (2) monensin sodium; (3) essential oils (Crina[®]); (4) tannins; and (5) zinc nanoparticles. These non-nutritive additives were evaluated to determine their effect as rumen fermentation modifiers by measuring rumen pH, volatile fatty acids (VFA) production, total gas production and methane emissions. From these results, it can be highlighted that essential oils showed a similar behavior to monensin sodium, maintaining the rumen pH and showing similar values in VFA production, with the exception of acetic acid, which significant decrease, in addition to increasing total gas production. On the other hand, tannins and zinc nanoparticles (ZnNPs) decreased VFA production and increased total gas production, whereas ZnNPs increased the rumen pH at the end of the fermentation period. These results suggest that essential oils show potential as an alternative to the use of monensin sodium in feedlot diets.

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de bovinos de carne en corral deben ser altamente rentables y productivos, debido a que el producto final de estos sistemas es la carne de bovino y presenta una gran demanda al formar parte de la dieta de la mayoría de la población, por su gran valor nutricional.

En este tipo de sistemas la fermentación ruminal es uno de los principales factores determinantes de una buena producción, los parámetros que determinan una correcta fermentación pueden ser modificados mediante el uso de aditivos no nutritivos. Entre los parámetros o variables más evaluados en cuanto la modificación de la fermentación ruminal se encuentran el pH del rumen, las emisiones de metano y la producción de los ácidos grasos volátiles (AGV). Estos parámetros son de gran importancia debido al impacto que pueden tener en el proceso de absorción de nutrientes y por lo tanto en la producción final.

Existen diferentes tipos de aditivos que pueden ser utilizados para este objetivo, como lo son los antibióticos y los ionóforos. Sin embargo, en la actualidad y principalmente en la Unión Europea existen restricciones para el uso de estos compuestos debido al desarrollo de una posible resistencia a este tipo de aditivos, además de la presencia de casos donde el uso de estos ha mostrado resultados adversos o perjudiciales en cuanto a residuos en los productos finales (OMS, 2005).

Hay una gran probabilidad que estas restricciones sean implementadas en el resto del mundo. Por tal motivo es necesario desarrollar y dar a conocer alternativas que puedan sustituir o disminuir el uso de sustancias químicas en los sistemas de producción. En la actualidad, existe gran interés por el uso de los metabolitos secundarios de las plantas (MSP) (Jouany y Morgavi, 2007), por lo que esto ha resultado en la evaluación de nitro componentes, taninos, saponinas, y recientemente otros componentes secundarios como los aceites esenciales (AE) de las plantas (Polín Raygoza *et al.*, 2014).

Estos últimos han destacado mucho debido a que muestran resultados similares utilizando compuestos químicos más comunes como por ejemplo la monensina sódica, principal aditivo utilizado para aumentar la producción de AGV y reducir la incidencia de acidosis ruminal, un problema muy común en los sistemas de producción de forma intensiva (Nagaraja y Titgemeyer, 2007).

Así mismo, cada vez más interés se ha mostrado para el control de las emisiones entéricas de metano ya que estas representan pérdidas de energía de entre 2 y 12% del consumo de energía bruta de los rumiantes, dependiente del nivel del consumo de alimento, así como la composición de la dieta. En parámetros productivos, existen reportes que confirman que una disminución de metano del 25% en los rumiantes puede resultar en incrementos de peso de 75 g/d en bovinos productores de carne (Polín Raygoza *et al.*, 2014).

Entre una de las alternativas recientemente evaluadas para la reducción de las emisiones de metano, además de los aceites esenciales, se encuentran las nanopartículas de minerales o nano minerales, que debido al tamaño de partícula pueden ser más fáciles de absorber dentro del tracto gastrointestinal dando como resultado una potencialización del efecto de cada uno de ellos.

Particularmente las nanopartículas de zinc han demostrado propiedades sobre las emisiones de metano, por ejemplo, en un estudio *in vitro* donde se evaluaron cuatro concentraciones de nZnO con dos dietas experimentales diferentes, para evaluar su eficacia en mitigar los gases de efecto invernadero. Obteniendo como resultados que nZnO a 500 y 100 µg/g reducen significativamente las concentraciones de los gases de efecto invernadero entre ellos el gas metano (CH₄), en comparación con el grupo control (Niloy Chandra *et al.*, 2018).

Como parte de la evaluación de las nanopartículas de zinc existen estudios que reportan el efecto de estas sobre la fermentación ruminal *in vitro*, destacando un aumento en la producción de AGV, sin mostrar ningún efecto sobre el nivel de pH ruminal (Chen *et al.*, 2011).

A su vez, cada día más interés se ha mostrado en el uso de los aceites esenciales en las dietas de bovinos para el mantenimiento del pH como método de control de la acidosis ruminal (Busquet *et al.*, 2006; Benchaar *et al.*, 2007).

Existen estudios que reportan que la inclusión de eugenol aumentó exponencialmente el pH a las 24 h, observándose un efecto con el nivel más alto con respecto al control. Así mismo en un estudio publicado recientemente, donde se evaluaron 102 aceites esenciales resaltan tres de estos con un potencial de reducción de la producción de metano *in vitro* *Anethum graveolens* (aceite de eneldo), *Lavándula latifolia* (lavanda) y *Ocimum basilicum* (albahaca) (Amanzougarene *et al.*, 2017).

En la producción de AGV de igual manera existen estudios reportados que mencionan que dosis bajas de aceite de orégano aumentan la concentración de AGV en un 39 a 56% (Castillejos *et al.*, 2008).

Sin embargo, estas son nuevas tecnologías, las cuales se deben comprender en su totalidad, en su funcionalidad y su forma de acción, al existir modificaciones en las condiciones del experimento los efectos pueden llegar a ser muy variados, es por esto que es necesario la realización de más estudios e investigaciones para lograr estandarizar las técnicas para su evaluación y las dosis efectivas.

En la presente tesis se evaluaron los efectos de una mezcla de aceites esenciales, taninos y un compuesto de nanopartículas de zinc sobre la fermentación ruminal *in vitro* en comparación con la monensina sódica, aditivo no nutritivo más comúnmente utilizado en los sistemas de producción. Esto con el fin de poder determinar su potencial como posibles alternativas, además, se enfatizó en la evaluación de estos compuestos y sus propiedades como mitigantes de las emisiones entéricas de metano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Fermentación ruminal

La fermentación ruminal se define como un proceso anaeróbico mediante el cual los compuestos orgánicos se convierten en compuestos más simples y se libera energía (Owens y Basalan, 2016). Este proceso es llevado a cabo por los microorganismos que habitan en el rumen tales como protozoarios, hongos y bacterias (Lovett *et al.*, 2006).

El producto final del proceso de fermentación ruminal son los AGV, principalmente acético, propiónico y butírico, que constituyen más del 90% de los ácidos que se producen en el rumen. El propiónico es el único ácido gluconeogénico y es responsable del 65 al 80% del suministro de glucosa (Reynolds *et al.*, 2003).

Otros productos del proceso fermentativo son el CO₂ e hidrógeno (H₂), los cuales no son utilizados por el rumiante, pero sirven como sustrato para una comunidad particular de microorganismos responsables de producir metano como estrategia metabólica para obtener la energía necesaria para su crecimiento (Schäfer *et al.*, 1999).

2.2 Ácidos grasos volátiles, pH y gas metano

Los AGV y el gas metano se encuentran entre los principales productos finales de la fermentación ruminal, mismos que están estrechamente relacionados con el valor de pH debido a su importancia como regulador de los procesos digestivos.

La mayoría de las bacterias del rumen muestran una óptima actividad y crecimiento cuando el pH ruminal se encuentra en valores de 6.0 a 6.9 (Van Soest, 1994). Por lo que se concluye que las fluctuaciones de pH pueden afectar la microbiota y por lo tanto a la fermentación ruminal.

Los AGV como producto final de la fermentación luego de ser absorbidos se convierten en los principales proveedores de energía para los procesos metabólicos de los rumiantes (Voelker y Allen, 2003).

En cuanto al gas metano se ha reportado la gran importancia de las emisiones entéricas de este ya que, representan pérdidas de energía de entre 2 y 12 % del consumo de energía bruta de los rumiantes, dependiente del nivel del consumo de alimento y tipo o composición de la dieta. Si transformamos estas pérdidas de energía a parámetros productivos, existen estudios que confirman que una disminución de metano del 25 % en los rumiantes puede resultar en incrementos de 1 litro de leche al día en vacas de alta producción, y de 75 g/d de incremento de peso en bovinos productores de carne (Polín Raygoza *et al.*, 2014).

2.3 Modificación de la fermentación ruminal

Poder realizar una manipulación de la fermentación ruminal para obtener procesos deseables y mejorar la eficiencia de conversión de los alimentos es una de las principales metas nutricionales, sin embargo, la complejidad de las interrelaciones de los microorganismos del rumen dificulta modificar aspectos de la fermentación sin alterar algunos otros. (Di Lorenzo, 2015). Uno de los métodos más utilizados para lograr la modificación de los perfiles de fermentación ruminal, además de las estrategias utilizadas en cuanto a la formulación de raciones, es el uso de aditivos incorporados en las mismas.

Entre estos aditivos destacan la utilización de ionóforos, desde el comienzo de la utilización de la monensina en los años 70 la investigación sobre ionóforos se incrementó rápidamente (Di Lorenzo, 2015). El mecanismo de acción de los ionóforos consiste en interrumpir el intercambio iónico y modificar los gradientes protónicos y catiónicos de la membrana celular de los microorganismos del rumen, mismos que inician un bombeo activo de protones hacia el exterior lo que les permite mantener las concentraciones iónicas y el equilibrio ácido-base en su interior, sin embargo estos procesos requieren de energía metabólica extra por lo que la energía disponible para el metabolismo y crecimiento bacteriano se reduce considerablemente (Pinos Rodríguez y González Muñoz, 2000).

2.4 Monensina sódica

La monensina sódica es un ionóforo monovalente que se obtiene de la fermentación de la bacteria *Streptomyces cinnamonensis*, su función consiste en el intercambio principalmente de iones de Na^{+1} , K^{+1} y Ca^{+2} a través de las membranas celulares. Además, presenta un efecto bacteriostático contra bacterias Gram positivas, por lo que su uso es conocido en la alimentación de rumiantes, ya que incrementa la eficiencia de transformación de los nutrientes en producto (Mcguffey, 1995).

La monensina está aprobada para su uso en varios países y se ha demostrado que mejora la utilización de los alimentos, al regular la variación del consumo en ganado de carne (Goodrich *et al.*, 1984). Además, este aditivo genera concentraciones más altas de propionato ruminal y tiene una reducción en la relación de acetato:propionato (Russell y Strobel, 1989).

Otro beneficio del uso de la monensina es que disminuye la producción de bacterias que sintetizan lactato, incrementando a las que no lo utilizan y evitando desordenes metabólicos como la acidosis ruminal y los timpanismos (Nagaraja, 1985).

2.5 Efecto de la monensina sódica sobre las emisiones de metano

La monensina también se ha probado con el objetivo de mitigar las emisiones de metano CH_4 , pero los resultados no son muy constantes (Guan *et al.*, 2006) por mencionar un ejemplo en un estudio de metaanálisis (Appuhamy *et al.*, 2013), la monensina mostró reducciones significativas de las emisiones de CH_4 (-19 g/día) en bovinos y en vacas lecheras (-6 g/día). Mientras que, en un estudio realizado sobre novillas de búfalo, la producción diaria de metano entérico se redujo en un 12.61%, con la utilización de monensina sin embargo no fue significativo en comparación con el tratamiento control (Gupta *et al.*, 2019).

2.6 Efecto de la monensina sódica sobre la producción de ácidos grasos volátiles

En un estudio realizado en vacas alimentadas con forrajes y harina de soya se logró observar que la adicción de monensina incrementó la producción de ácido propiónico y a su vez mostró reducción en la relación acetato: propionato, cabe mencionar que dicho efecto fue más marcado cuando existió una mayor proporción de la harina de soya (Che Ming y Russell, 1993).

Existen estudios *in vitro* donde se simula la fermentación ruminal en sistemas de tipo continuo o semicontinuo como por ejemplo el realizado por Capelari y colaboradores en el 2018, donde por medio de un sistema semicontinuo evaluaron el efecto de la monensina sódica y del nitrato en las dietas comúnmente utilizadas tanto para ganado lechero como para ganado de producción de carne, observando que la monensina afectó significativamente la producción de AGV mostrando un aumento de ácido propiónico y una disminución en el ácido acético dando como resultado la siguiente relación acético: propiónico, dieta utilizada comúnmente para ganado lechero (1.6 vs. 2.0; $P < 0.01$) y en la dieta utilizada comúnmente para ganado en producción de carne (1.6 vs. 1.9; $P < 0.01$).

2.7 Efecto de la monensina sódica sobre el pH ruminal

Bezerra da Silva en el 2015 en un estudio realizado en ovinos, donde se pretendía evaluar el efecto de distintas concentraciones de extracto de etanol en comparación con la monensina sódica sobre la fermentación ruminal, observó que la monensina sódica fue más eficiente para mantener valores más altos de pH (6.1) y para reducir la ingesta de materia seca.

Coneglian y colaboradores en el 2018, utilizaron la monensina sódica como tratamiento control en un estudio donde el objetivo era evaluar el comportamiento de dos aceites esenciales sobre la ingesta, digestibilidad y fermentación ruminal en ganado de carne alimentado con dietas altas en grano. En el cual se observó que la monensina sódica logró mantener niveles adecuados de pH (6.35) al término del periodo experimental el cual tuvo una duración de 21 días.

2.8 Aceites esenciales

Se definen los aceites esenciales como compuestos químicos aromáticos volátiles, que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Entre las propiedades que presentan los AE están sus efectos como antioxidantes, algunos otros muestran propiedades que estimulan la digestión, aumentan la regulación del metabolismo gastrointestinal o mejoran la capacidad de absorción de nutrientes, esto debido a su relación con la actividad enzimática es por esto por lo que se comenzó con la evaluación de estos como una posible alternativa de uso a los aditivos comúnmente utilizados en nutrición animal (Martínez Ricardo *et al.*, 2015).

2.9 Efecto de los aceites esenciales sobre las emisiones de metano

En un estudio realizado en el Instituto de Ciencia Animal de la Habana, Cuba, se evaluó el efecto de aceite esencial de cítrico (0, 25, 50 y 75 $\mu\text{L}/75\text{ mL}$ de fluido ruminal bufferado) y limoneno su componente principal (0, 30, 45 y 60 $\mu\text{L}/75\text{ mL}$ fluido ruminal bufferado) sobre la producción total de gas *in vitro* y las emisiones de metano, encontrando que limoneno a 45 $\mu\text{L}/75\text{ mL}$ y 60 $\mu\text{L}/75\text{ mL}$ disminuye las emisiones de metano cuando estas fueron expresadas en base de materia seca pero cuando se expresaron en base de materia orgánica digerida el aceite esencial de cítrico a 75 $\mu\text{L}/75\text{ mL}$ disminuyó la emisión de metano (Sallam *et al.*, 2010).

Otro estudio reciente donde se evaluaron diferentes dosis del aceite esencial de clavo de olor (CLO), reportaron resultados que ha comparación con el control (CON), la producción de metano disminuyó ($p \leq .05$) en 16, 18 y 30% con aumentos de 125, 250, 500 mg/L de CLO (Gunal *et al.*, 2017).

2.10 Efecto de los aceites esenciales sobre la producción de ácidos grasos volátiles

En el departamento de Ciencia Animal y Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona y en colaboración con el instituto de Biotecnología Vegetal y Agricultura de la Universidad de Leeds en el Reino Unido, se realizaron estudios en un sistema *in vitro* de doble flujo continuo con el objetivo de determinar el efecto del cinamaldehido y el extracto de ajo sobre el perfil de fermentación ruminal. Observando una mayor proporción molar de ácido propiónico con los tratamientos de cinamaldehido a 100 mg/día y extracto de ajo a 1,000 mg/día lo cual sugiere una mejora en la eficiencia de energía parecida a la mostrada por la monensina sódica a 40 mg/día (Busquet *et al.*, 2003).

Un estudio publicado recientemente menciona que el aceite de hoja de clavo a 500 mg/L aumentó los AGV totales y el pH final. Otro resultado observado es que a dosis más bajas de aceite de orégano aumenta la concentración de AGV entre 39 a 56% (Castillejos *et al.*, 2008).

2.11 Efecto de los aceites esenciales sobre el pH ruminal

En un estudio se realizaron dos experimentos para evaluar varios compuestos activos de aceites esenciales sobre la fermentación microbiana del rumen. En el primer experimento y usando un sistema de cultivo discontinuo se evaluaron 4 dosis ascendentes de 5 aceites esenciales (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de cinco componentes de aceites esenciales sobre el pH ruminal

Componente	Dosis mg/L				
	0	5	50	500	5000
Limoneno	6.46	6.49	6.50	6.50	6.60
Guaiacol	6.14	6.28	6.26	6.19	6.59
Vainillina	6.14	6.15	6.13	6.11	6.40
Timol	6.46	6.50	6.47	6.87	7.38
Eugenol	6.46	6.42	6.43	6.56	7.35

Estos resultados arrojaron que la dosis más alta de cada uno de ellos aumentó el pH al final del periodo de fermentación, el cual tuvo una duración de 24 horas (Castillejos *et al.*, 2006).

2.12 Nanopartículas de zinc

Las nanopartículas de zinc (ZnNPs) se pueden definir como un nano mineral con dimensiones de 1-100 nm (Figura 1), que tienen como cualidades la estabilidad a altas temperaturas y presiones y que debido a estas características tienen mayor facilidad a ser absorbidos por el tracto gastrointestinal mostrando un efecto potencializado del elemento a dosis más bajas esto debido a su mejor aprovechamiento (Swain *et al.*, 2016).

2.13 Efecto de las nanopartículas de zinc sobre las emisiones de metano

En un estudio realizado bajo condiciones *in vitro* donde se evaluaron 4 niveles diferentes de ZnNPs 100, 200, 500 y 1,000 µg/g en dos dietas experimentales diferentes, se incubaron durante 72 horas 250 mL de líquido ruminal con cada uno de los tratamientos, para monitorear la producción total de gas se utilizó un sistema de producción continua (Ankom Technology® Macedon, NY, Estados Unidos) y se analizaron para gases de efecto invernadero, los resultados mostraron que el nivel más alto de ZnNPs redujo la concentración de metano en un 53.65% (Niloy Chandra *et al.*, 2018).

2.14 Efecto de las nanopartículas de zinc sobre la producción de ácidos grasos volátiles

En un estudio realizado en el Instituto de Nutrición Animal de la Universidad Agrícola de Sichuan en China, se evaluaron 5 concentraciones de ZnNPs 0, 50, 100, 200 y 400 mg/kg de materia seca sobre la fermentación ruminal. Los resultados de este estudio mostraron un aumento significativo de la producción de AGV durante las etapas tempranas de incubación, es decir en las primeras 6 y 12 horas con las concentraciones de 100 y 200 mg/kg de DM (Chen JunCai *et al.*, 2011).

2.15 Efecto de las nanopartículas de zinc sobre el pH ruminal

Chen JunCai y colaboradores en 2011, en un estudio donde se evaluó el efecto de la suplementación con nanopartículas de zinc a 5 concentraciones diferentes 0, 50, 100, 200 y 400 mg/kg de materia seca sobre la fermentación ruminal. Los resultados del experimento mostraron que el pH no se vio afectado a ninguna de las concentraciones utilizadas ($P < 0.05$).

2.16 Taninos

Los taninos se definen como un grupo de fenoles solubles en agua con diferencias químicas los cuales se unen con proteínas, iones metal, aminoácidos y polisacáridos para formar complejos solubles o insolubles (Hagerman *et al.*, 1992). Se pueden dividir en dos grupos los hidrolizables y los condensados, mismos que se pueden encontrar tanto en árboles forrajeros como arbustos además de frutas, leguminosas, cereales y granos (Vélez Terranova *et al.*, 2014).

2.17 Efecto de los taninos sobre las emisiones de metano

En una investigación donde el objetivo era evaluar el efecto de dos fuentes de taninos condensados (acacia y quebracho) y dos más de taninos hidrolizables (castaño y galonea) sobre la producción de metano y la fermentación ruminal *in vitro*. La adición de taninos de acacia y castaño a dosis \geq que 50 g/kg de MS o taninos de quebracho a \geq 100 g/kg de MS mostró una disminución de hasta un 40% en la producción de metano, sin embargo, disminuyó la concentración de AGV. Los taninos de Valonea a 50 g/kg de MS redujo en un 11% la producción de metano sin afectar la concentración de AGV (Hassanat y Benchaar, 2013).

2.18 Efecto de los taninos sobre la producción de ácidos grasos volátiles

En un estudio donde el objetivo era evaluar la fuente de taninos, condensados vs hidrolizables sobre el rendimiento, eficiencia alimenticia, parámetros de fermentación ruminal y rasgos de la canal y no-canal en la etapa de finalización de bovinos de carne. Se observó que no hubo diferencias significativas en la proporción molar de butirato, de igual

manera ninguna de las fuentes de taninos mostró efecto en las proporciones molares de acetato y propionato, ni en la concentración total de AGV (Krueger *et al.*, 2010).

2.19 Efecto de los taninos sobre el pH ruminal

Se realizó un experimento para evaluar el contenido bajo y el contenido alto (1 y 3%) de taninos en la planta *Lotus corniculatus L.* y su efecto sobre la digestibilidad y composición de líquido ruminal de ovejas, antes de la alimentación y 3 y 6 horas después (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de dos niveles de taninos contenidos en *Lotus corniculatus L* sobre el pH ruminal

Variable	Tiempo (H)	Tanino (1%)	Tanino (3%)
pH	0	7.4	7.4
	3	6.7	6.7
	6	6.5	6.5

Se encontró que el comportamiento del pH fue similar en las dietas con contenidos bajo y alto de taninos, mostrando una disminución al paso del tiempo (Chiquette *et al.*, 1989).

3. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto tiene como propósito encontrar una alternativa viable a los compuestos antimicrobianos utilizados comúnmente como modificadores de la fermentación ruminal, así como una opción para reducir las emisiones de metano mejorando la eficiencia productiva y reduciendo el daño al medio ambiente.

4. HIPOTESIS

Los aceites esenciales, taninos y las nanopartículas de zinc poseen propiedades que pueden modificar la fermentación ruminal *in vitro* y reducir las emisiones de metano como una alternativa a compuestos antimicrobianos utilizados comúnmente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar una mezcla de aceites esenciales y un compuesto de nanopartículas de zinc en comparación con el uso de monensina sódica como modificadores de la fermentación ruminal *in vitro* y sus propiedades reductoras de las emisiones de metano.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de los aceites esenciales, taninos y las ZnNPs *in vitro* como amortiguadores del pH ruminal.
- Determinar la producción de AGV en líquido ruminal *in vitro* usando aceites esenciales, taninos y ZnNPs como aditivos.
- Evaluar las propiedades de los aceites esenciales, taninos y ZnNPs como reductores de las emisiones de metano.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Grupos de estudio

Se establecieron cinco grupos experimentales: (1) grupo control (CON) alimento preparado sin aditivo, (2) grupo de monensina sódica (MON), alimento preparado con una concentración de 40 ppm de monensina sódica al 90% por tonelada de alimento preparado, (3) AE, alimento preparado con una mezcla comercial de aceites esenciales Crina[®] DSM a una concentración de 100 ppm por tonelada de alimento (4) ZnNPs, alimento preparado con una concentración de 1,000 ppm por tonelada de alimento de ZnNPs y (5) grupo taninos (TAN), alimento preparado con una concentración de 1,500 ppm de taninos condensados por tonelada de alimento preparado.

6.2 Obtención del líquido ruminal

El líquido ruminal se obtuvo de un toro de la raza Beefmaster con un peso aproximado de 790 kg y 48 meses de edad el cual fue previamente fistulado y adaptado a una ración de alimento con un 14% de proteína, sin ningún tipo de aditivo no nutritivo y la cual cumple con los requerimientos nutricionales para el peso y edad del animal (Tabla 3). La ración de alimento fue ofrecida dos veces al día, por la mañana y por la tarde, el acceso a agua fresca fue *ad libitum*. El alojamiento se realizó de manera individual en un corral de manejo con un área total de 30 m² equipado con una prensa de manejo, utilizada en el momento de la obtención del líquido y el cual se encuentra ubicado en el Centro de Exposiciones Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se obtuvieron 500 mL de líquido ruminal previo a la primera ingesta de alimento del día, se filtró mediante dos capas de estopilla y se depositó en un termo que contenía agua a una temperatura de 39 °C, con la finalidad de mantener temperaturas similares al rumen del animal. Posteriormente, fue transportado al Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con sede en el campus de Ciencias Agropecuarias de la UANL donde se utilizó inmediatamente y se le realizó un gaseo con CO₂ con el fin de mantener el ambiente anaeróbico.

Tabla 3: Dieta de adaptación

Ingredientes	Kg/Tonelada
Zacate heno	370
Alfalfa pellet	50
Maíz, molido	339
G.S. destileria-28	119
Pasta de soya-46	45
Melaza	60
Carbonato de calcio	8.5
Fosfato dicalcico-21	8
Micromin	0.50
Total	1,000

6.3 Producción de gas

La producción de gas se determinó con el sistema de producción de gas RF (Ankom Technology® Macedon, NY, Estados Unidos). Se colocaron 50 mL de líquido ruminal en botellas equipadas con puerto septa y módulo de producción de gas RF, y se mezclaron con 1 gramo de sustrato de cada uno de los tratamientos utilizados: CON, MON, AE, TAN y ZnNPs.

Los sustratos se obtuvieron a partir de los ingredientes de la dieta más los tratamientos utilizados, adecuando las concentraciones para 1 kg de alimento. Los sustratos fueron secados por 4 horas en una estufa de aire forzado a 60 °C (Fisher Scientific® Hampton, Nuevo Hampshire, Estados Unidos), posteriormente fueron molidos para pasar por una criba de 1 mm en un molino Thomas-Wiley Modelo 4 (Thomas Scientific® Swedesboro, NJ, Estados Unidos).

Finalmente, las botellas con el líquido ruminal y los substratos se incubaron en un baño María (Precisión Scientific® Coimbatore, Tamil Nadu, India) a 39 °C con movimientos rotatorios, simulando las condiciones normales del rumen. El monitoreo de la temperatura dentro de las botellas, la producción total de gas y el manejo del equipo se realizó mediante el software de sistema de producción de gas RF en su versión GPM 9.6 (Ankom Techonology® Macedon, NY, Estados Unidos).

6.4 Determinación de pH y ácidos grasos volátiles

Después de 24 horas de fermentación se determinó el pH del contenido de las botellas mediante el uso de un potenciómetro VB10 (Denver Instrument® Bohemia, NY, Estados Unidos). Una vez realizada la medición de pH, el líquido ruminal se depositó en frascos de plástico que contenían 1 mL de ácido meta-fosfórico, el cual detuvo el proceso de fermentación. Los frascos fueron refrigerados durante 30 minutos y posteriormente congelados y almacenados a 20 °C hasta el momento del análisis.

Para la determinación de AGV se calibró el equipo mediante un estándar preparado con las siguientes soluciones de ácidos a un volumen de 100 mL (Tabla 4).

Tabla 4: AGV standard

	Ácido	Mw	Vol.µL	Conc..g/L
1	Acético	60.05	330	3.46
2	Propiónico	74.08	400	3.97
3	Butírico	88.10	160	1.530

El análisis del líquido ruminal fue realizado mediante la técnica de cromatografía en un cromatógrafo modelo Star 3400 Cx (Varian® Palo Alto, California, Estados Unidos), equipado con una columna ZB- WAX de 30 mts x 0.53 mm x 0.5 µm (Phenomenex® Torrance, California, Estados Unidos) utilizando nitrógeno como gas de arrastre y un detector de tipo FID (detector de ionización de flama).

Al momento del análisis se realizó el descongelamiento de las muestras, éstas antes de poder ser inyectadas al cromatógrafo se les realizó un proceso de preparación el cual consiste en una decantación del líquido ruminal en tubos de 5 mL (Vacutainer™, Becton Dickinson and Company® Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) los cuales fueron centrifugados a 10,000 g durante 10 minutos en una centrifuga modelo Universal 320R (Hettich zentrifugen® Tuttlingen Alemania). Posteriormente se obtuvieron 5 mL de líquido sobrenadante y se mezclaron con 1 mL de ácido meta-fosfórico solución 2EB. (solución de ácido meta fosfórico al 25% (peso/volumen) que contiene 2 g/L de ácido 2-etil butírico).

Posteriormente se colocaron los tubos con la mezcla en un baño de hielo durante más de 30 minutos, transcurrido este tiempo se realizó un segundo proceso de decantación y centrifugado a 10,000 g durante 10 minutos para después y mediante el uso de una jeringa Hamilton se realizó la inyección directa en el cromatógrafo de gases.

El volumen inyectado del líquido al cromatógrafo fue de 1 µL, las temperaturas del inyector y detector fueron de 250 °C, mientras que para la columna se realizó primeramente un calentamiento a 90 °C durante 2 minutos para después aumentar 20 °C/minuto hasta llegar a una temperatura final de 200 °C y estabilizarse durante 3 minutos. El software utilizado para el manejo del equipo, así como para la lectura de los cromatogramas fue el Software Control – Varían Star 3400cx (Varían® Palo Alto, California, Estados Unidos).

6.5 Determinación de metano

La determinación de metano fue realizada a 8 diferentes tiempos de fermentación (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas), las muestras de gas fueron obtenidas del espacio libre de líquido de la botella por vía del puerto septa mediante el uso de una jeringa de 500 microlitros Gas Tight, punta 2 (Hamilton Instrument® Cinnaminson, NJ, Estados Unidos) la cual reduce al mínimo las fugas que pudieran existir. Estas muestras fueron depositadas en tubos al vacío (Vacutainer™, Becton Dickinson and Company® Franklin Lakes, Nueva Jersey, Estados Unidos) para ser almacenadas en refrigeración hasta el momento del análisis.

Primeramente, se realizó la calibración del equipo generando la curva mediante la utilización de un estándar de calibración de gas metano al 99% de pureza para posteriormente poder realizar mediante inyección directa el análisis de los gases.

El análisis de las muestras se realizó por la técnica de cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo modelo Star 3400 Cx (Varían® Palo Alto, California, Estados Unidos). El cromatógrafo estaba equipado con una columna para separación de gases permanentes con medidas de 30 mts x .53 mm x 15 micrones, y un detector del tipo FID.

El volumen de gas inyectado fue de 200 μ L, mientras que como gas acarreador se utilizó nitrógeno. La temperatura del inyector fue de 200 °C, mientras que la del detector fue de 250 °C, mientras que para la columna se utilizó una temperatura de 150 °C (isotérmica). El software que se utilizó para el manejo del equipo, así como para la lectura de los cromatogramas fue el Software Control – Varían Star 3400 Cx (Varían® Palo Alto, California, Estados Unidos).

6.6 Análisis de datos

El experimento fue realizado en cuatro repeticiones, además se recolectaron muestras puras a tiempo cero para utilizar como valor de referencia y tomando en cuenta los 5 tratamientos a evaluar, se tomó 1 muestra para pH y AGV obteniendo un total de 20 y 24 resultados para cada una de estas dos variables respectivamente, mientras que para la determinación de gas metano y debido a que se obtuvieron muestras en cada uno de los 8 tiempos se cuenta con 120 resultados en total. Estos datos fueron analizados mediante el uso del software para análisis estadísticos Minitab 17 (Minitab Statistical Software® Minitab, LLC. State College, Pennsylvania, EE. UU.). El modelo estadístico del estudio fue completamente al azar, mientras que la comparación de medias se realizó por el método de Fisher.

7. RESULTADOS

7.1 Nivel de pH

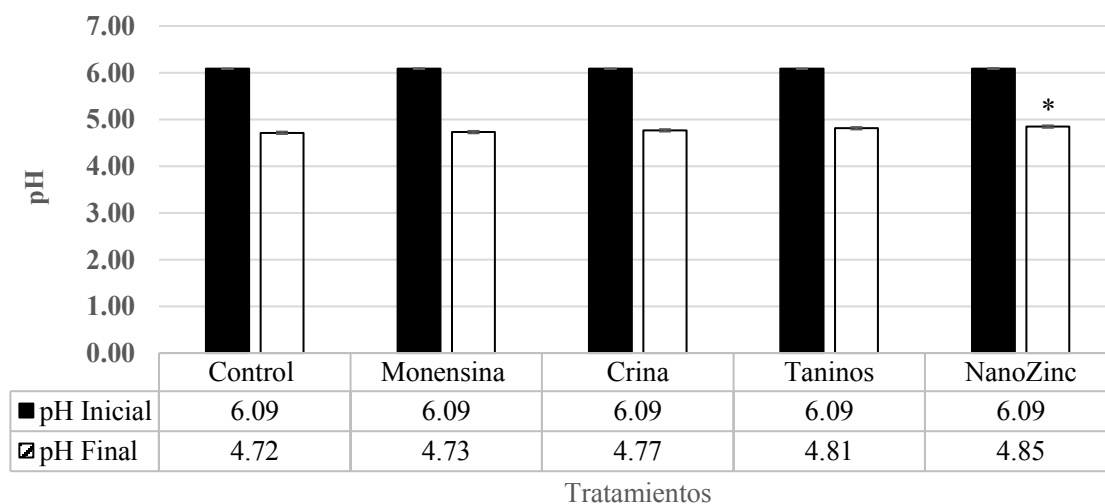
En la Tabla 5 y su gráfico correspondiente en la Figura 1, se pueden observar los resultados obtenidos en cuanto a la variable de pH. En donde se reporta un comportamiento similar entre todos los tratamientos a excepción del tratamiento ZnNPs, el cual presenta un mayor efecto como amortiguador del valor pH manteniendo un nivel más alto significativamente con respecto a los demás tratamientos.

Tabla 5: Niveles medios de pH iniciales y finales por tratamiento

Tratamiento	pH Inicial	pH Final
Control	6.09	4.72 ^a
Monensina	6.09	4.73 ^a
Crina	6.09	4.77 ^a
Taninos	6.09	4.81 ^a
Nanopartículas de zinc	6.09	4.85 ^b

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05)

Figura 1: Gráfico de niveles medios de pH iniciales y finales por tratamiento



* Las barras marcadas con “*” indican la diferencia significativa entre tratamientos (P<0.05)

7.2 Producción de AGV

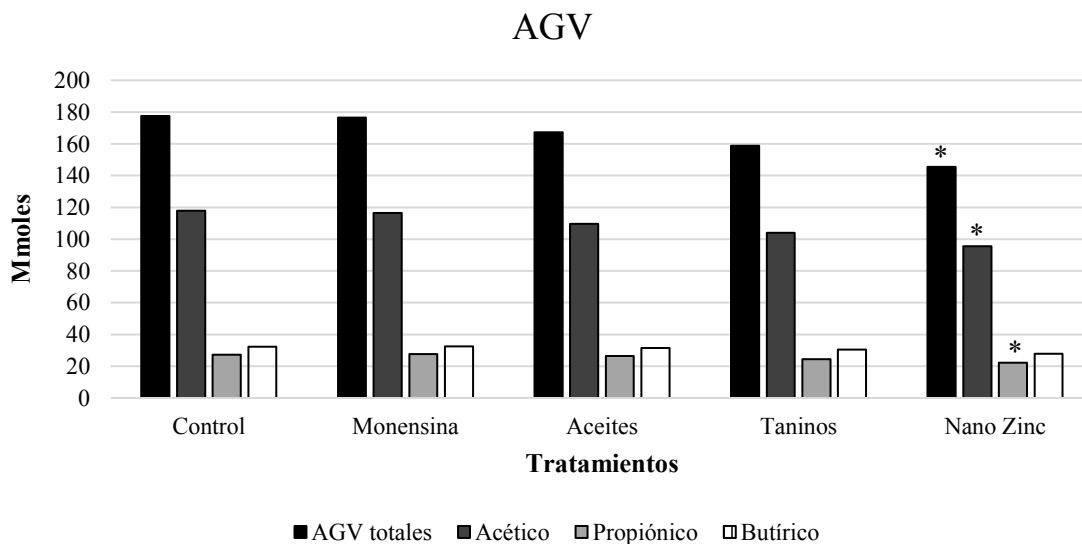
En la Tabla 6 y la Figura 2 se pueden observar los resultados obtenidos en la producción de AGV después de las 24 horas de fermentación. Todos los tratamientos mantuvieron un comportamiento similar a diferencia del tratamiento ZnNPs, en el cual se pudo observar una disminución de la producción de AGV totales, así como de manera individual en el acético y propiónico.

Tabla 6: Producción de AGV (Mmoles) a 24 horas de fermentación

Tratamiento	Totales	Acético	Propiónico	Butírico
Control	177.5 ^a	117.8 ^a	27.3 ^a	32.3 ^a
Monensina	176.5 ^a	116.4 ^a	27.6 ^a	32.4 ^a
Crina	167.2 ^{ab}	109.5 ^{ab}	26.3 ^a	31.3 ^a
Taninos	158.8 ^{ab}	103.9 ^{ab}	24.3 ^{ab}	30.5 ^a
Nano zinc	145.5 ^b	95.4 ^b	22.2 ^b	27.8 ^a

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05)

Figura 2: Gráfico de producción de AGV (Mmoles) a 24 horas de fermentación



* Las barras marcadas con “*” indican la diferencia significativa entre tratamientos (P<0.05).

7.3 Producción de gas total

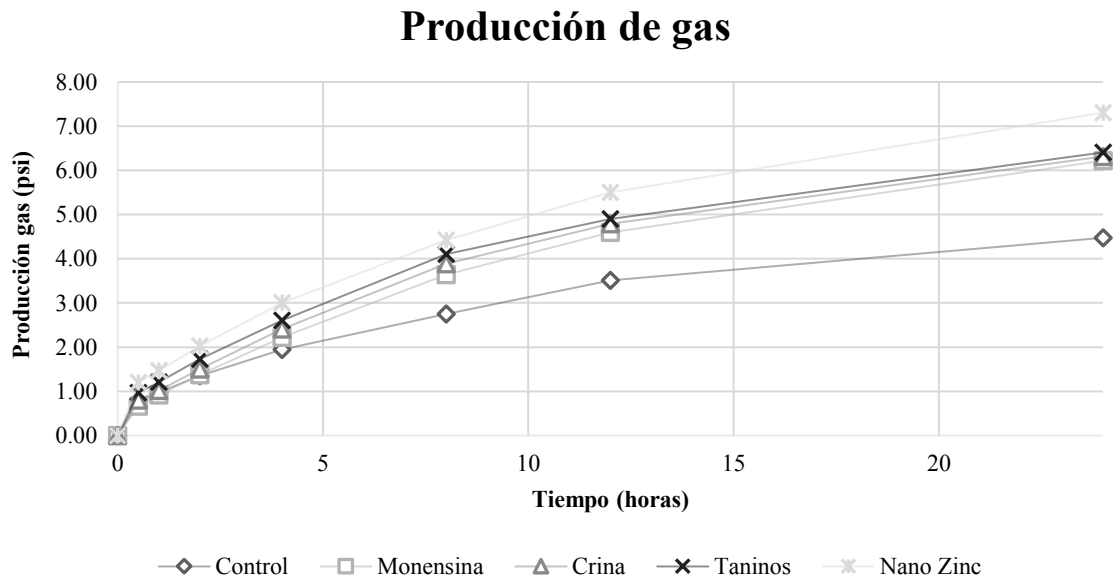
Por su parte la Tabla 7 y la Figura 3, muestran los resultados obtenidos en la producción de gas total, en las cuales se puede observar diferencias significativas de una mayor producción de gas a distintos tiempos de fermentación y en los diferentes tratamientos. Los aceites esenciales mostraron una mayor producción de gas a las 12 y 24 horas de fermentación, en cuanto a los taninos su producción de gas más alta significativamente ocurrió a las 8, 12 y 24 horas de fermentación, mientras que las nano partículas de zinc mostraron una producción de gas más alta significativamente con respecto a los demás tratamientos a partir de la primera hora de fermentación.

Tabla 7: Producción de gas (psi) a distintos tiempos de fermentación

Tiempo (horas)	Control	Monensina	Aceites	Taninos	Nanozinc
0.5	0.77 ^{ab}	0.67 ^b	0.80 ^{ab}	0.97 ^{ab}	1.20 ^a
1	0.98 ^b	0.92 ^b	1.02 ^b	1.21 ^{ab}	1.47 ^a
2	1.36 ^b	1.38 ^b	1.51 ^b	1.73 ^{ab}	2.03 ^a
4	1.95 ^c	2.22 ^{bc}	2.41 ^{abc}	2.60 ^{ab}	3.00 ^a
8	2.75 ^b	3.64 ^{ab}	3.89 ^{ab}	4.11 ^a	4.42 ^a
12	3.51 ^b	4.60 ^{ab}	4.80 ^a	4.90 ^a	5.51 ^a
24	4.48 ^b	6.22 ^{ab}	6.32 ^a	6.41 ^a	7.31 ^a

*Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05)

Figura 3: Gráfico de producción de gas (Psi) a distintos tiempos de fermentación



8. DISCUSIÓN

8.1 Monensina sódica

La monensina sódica no presentó un incremento significativo sobre el valor de pH con respecto al tratamiento control, estos resultados son similares a los presentados en un estudio donde se evaluó una mezcla de aceites esenciales y monensina sódica sobre la fermentación ruminal en vacas lecheras (Ferreira de Jesús *et al.*, 2016). Sin embargo, aunque no exista un incremento, la monensina sódica mantiene los valores de pH, lo que concuerda con lo reportado en los estudios de Bezerra da Silva, 2015 y Coneglian *et al.*, 2018, en donde la monensina mantenía valores entre 6.1 y 6.3, estos efectos permiten demostrar sus propiedades para prevenir desórdenes metabólicos como el timpanismo y la acidosis ruminal.

Por otra parte, existen estudios que mencionan un efecto de la monensina sódica sobre la producción de AGV, dichos estudios sugieren que esta puede aumentar la síntesis de ácido propiónico y disminuir la del ácido acético, mejorando así la relación acético:propiónico (Che Ming y Russell, 1993). Los resultados de la monensina sódica en nuestro estudio, mostraron una pequeña tendencia a dicho efecto, sin embargo, no fue significativo.

En cuanto a la producción de gas total la monensina sódica no mostró un efecto significativo en comparación con los demás tratamientos. Sin embargo, se puede observar una diferencia numérica con respecto al control a una mayor producción de gas a partir de la segunda hora de fermentación. Caso contrario a lo reportado en un estudio sobre fermentación ruminal donde se mostraba una disminución en la producción de gas total (Bartley *et al.*, 1979).

8.2 Aceites esenciales

Los aceites esenciales mostraron una mayor diferencia numérica en el aumento del valor de pH con respecto al control y al tratamiento con monensina, sin embargo, este no resultó significativo, aun así, es importante mencionar que en estudios donde se evaluaron aceites esenciales a dosis altas, se pudo observar significativamente un aumento en el valor pH (Castillejos *et al.*, 2006). Por lo que la eficacia de los aceites como amortiguadores del valor del pH puede estar dada por la dosis utilizada.

En cuanto a la producción de AGV los aceites esenciales mostraron una disminución en la producción de ácido acético con respecto al control, además de tener un comportamiento similar en cuanto a la producción de ácido propiónico y butírico con respecto al tratamiento con monensina sódica y un efecto mínimo con respecto al control. Resultados similares se mostraron en un estudio donde se evaluó la misma mezcla de aceites esenciales, y en donde los resultados al utilizar el aditivo no diferían significativamente en la producción de AGV con respecto tratamiento control, observando 35.4 y 35.6 mmoles/día respectivamente (Fernández *et al.*, 2005).

La producción de gas total incrementó significativamente con el tratamiento de aceites esenciales a las 12 y 24 horas de fermentación, caso contrario a lo reportado por Castillejos y colaboradores en el 2003. En este estudio evaluaron dosis crecientes de la misma mezcla de aceites esenciales sobre parámetros de fermentación, similares a los de nuestro estudio y en donde se observó una disminución en la producción de gas total.

8.3 Taninos

Los taninos presentaron un nivel de pH más alto con respecto a los tratamientos con aceites esenciales, monensina sódica y el tratamiento control, sin embargo, este efecto sigue siendo no significativo. Estos resultados difieren a lo reportado por Volpi Lagreca *et al.*, 2014, donde observaron una disminución del valor pH al tratar con taninos del tipo condensados similares a los utilizados en esta investigación.

En cuanto a la producción de AGV se observó una disminución significativa en la producción de ácido acético y ácido propiónico, no así para la producción de ácido butírico esto con respecto al control. Estos resultados varían a los presentados por Hervás *et al.*, 2003, en donde se evaluaron diferentes dosis de taninos (0.5, 1.5 y 3.0 g/kg), los cuales presentaron un efecto significativo en la producción de AGV.

Los taninos mostraron diferencias significativas en cuanto a la producción de gas total, en donde se pudo observar una mayor producción a las 8, 12 y 24 horas de fermentación. Estos resultados son contrastantes a los mencionados por Hassanat y Benchaar, 2012, donde se evaluaron dos tipos de taninos, condensados e hidrosolubles, observando que la producción de gas disminuía conforme se incrementaba la dosis de taninos. Cabe mencionar que dichas dosis eran 200 veces mayores a las utilizadas en esta investigación.

8.4 Nanopartículas de zinc

Las ZnNPs presentaron un incremento significativo en el valor de pH después de 24 horas de fermentación con respecto a los demás tratamientos utilizados. Estos resultados son contradictorios a los reportados en un estudio donde se evaluaron cinco niveles de suplementación (0, 50, 100, 200, 400 mg/kg de MS) y en donde el pH no se vio afectado por la adición de ninguno de estos niveles (Chen JunCai *et al.*, 2011). Sin embargo, cabe mencionar que la dosis utilizada en nuestra investigación es el doble de nivel más alto utilizado en el estudio mencionado.

En cuanto a la producción de AGV las ZnNPs mostraron una disminución significativa con respecto a los demás tratamientos en la producción de ácido acético y ácido propiónico. En cuanto al ácido butírico de igual manera se presentó una disminución, aunque esta no fue significativa. .

Estos resultados pueden compararse con los presentados por Riazi *et al.*, 2019, donde se evaluó el efecto de la suplementación de nano zinc sobre la fermentación ruminal, observando mejoras significativas en la relación acetato:propionato. Cabe mencionar que las dosis utilizadas en dicho estudio fueron de alrededor del 50% a las utilizadas en esta investigación, por lo que rebasar dosis de más de 60 mg/kg de materia seca puede afectar la producción de AGV.

La producción de gas total por parte de las ZnNPs fue significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos a partir de la primera hora de fermentación y hasta el final de esta.

Estos resultados varían con los reportados por Niloy Chandra *et al.*, 2018, donde se evaluaron diferentes niveles de ZnNPs y su efecto sobre parámetros de fermentación ruminal, observando que las ZnNPs no presentaron diferencias significativas en términos de producción de gas total con las diferentes dosis aplicadas.

9. CONCLUSIONES

De todos los aditivos no-nutritivos evaluados, los aceites esenciales mostraron características de fermentación ruminal similares a la monensina sódica por lo que presenta potencial para seguir siendo evaluado como alternativa al uso de este ionóforo. Las ZnNPs mostraron efectos benéficos con respecto al pH ruminal, sin embargo, también se observaron efectos adversos en otras variables evaluadas como una menor producción de AGV y una mayor producción de gas total. Este efecto negativo pudiera deberse a la alta dosis utilizada en este estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R. (2003). Study on effect of increasing dose of an essential oils mixture on nitrogen metabolism and fermentation profile in a continuous culture system. *ITEA (Información Técnica Económica Agraria). Producción Animal (España)*.
- Castillejos, L. Calsamiglia, S. Ferret, A. (2006). Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in In Vitro Systems *Journal of Dairy Science*, 89, pp. 2649-2658.
- Castillejos L., Calsamiglia S., Martín-Tereso, J., Ter Wijlen, H. (2008). Evaluación in vitro de los efectos de diez aceites esenciales en tres dosis sobre la fermentación ruminal de dietas de tipo feedlot de alto concentrado. *Ciencia y tecnología de alimentación animal* 145, pp. 259-270.
- Capelari, Matheus, Johnson, Kristen, Latack. (2018). The effect of encapsulated nitrate and monensin on ruminal fermentation using a semi-continuous culture system *Revista de Ciencia Animal* 96.
- Che-Ming JY, Russell B. (1993). The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino acid-fermenting bacteria. *J. Anim. Sci.* 71, pp. 3470-3476.
- Fernanda Gomes Bezerra da Silva, Sandra Mari Yamamoto, Eva Mónica Sarmento da Silva, Mario Adriano Ávila Queiroz, Layse Araújo Gordiano, Marcela Almeida Formiga. (2015). Extracto de propóleo y monensina sódica en fermentación ruminal y Parámetros hematológicos en ovino. *Acta Scientiarum Animal Sciences* 37 pp. 273-280.
- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H., Krause, D.O. (2006). Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*, 84, pp. 1896–1906.
- Gupta, S., Mohini, M., Malla, BA *et al.* (2019). Effects of monensin feeding on performance, nutrient utilization, and enteric methane production in growing buffalo heifers. *Trop Anim Health Prod* 51 pp. 859.
- Russell, J. B., & Strobel, H. J. (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 55, pp. 1.

- J. Chen, W. Wang, Z. Wang. (2011). Effect of nano-zinc oxide supplementation on in vitro ruminal fermentation. *Chin J Animal Nutr.* pp. 023.
- Lovett, D., K. Stack, L. Lovell, S. Callan, J. Flynn, B. Hawkins, M. O'Mara, F., P. (2006). Effect of feeding *Yucca schidigera* extract on performance of lactating dairy cows and ruminal fermentation parameters in steers. *Livestock Science*, 102, 23-32.
- Martínez Martínez R.; Ortega M. E.; Herrera J. G.; Kawas Garza, J. R.; Zarate Ramos, J.; Robles Soriano, R. (2015). Uso de aceites esenciales en animales de granja. *Interciencia*, 40, pp. 744-750.
- Busquet, M. Calsamiglia, S. Ferret, A. Kamel. C. (2003). Efecto del cinamaldehído y el extracto de ajo sobre la degradación de proteína y el perfil de fermentación en cultivos continuos. *Itea* 24 pp. 729-731.
- Di Lorenzo, N., Rostoll, L., Ardanaz, S., Guevara Ballesteros, R., García Ascolani, M., Ruiz Moreno M. (2015). XVIIº Congreso Bienal AMENA. University of Florida, North Florida Research and Education Center, Marianna, FL, USA.
- Niloy Chandra Sarker, Faithe Keomanivong, MD Borhan Shafiqur Rahman y Kendall Swanson. (2018). In vitro evaluation of zinc nano oxide (nZnO) to mitigate gaseous emissions *Journal of Animal Science and Technology*, 60, número de artículo: 27.
- Owens FN, Basalan M. Millen D., De Beni Arrigoni M., Lauritano Pacheco R. (2016). Ruminal fermentation *Rumenología*. pp. 63-102.
- Partha S. Swain, Somu B.N. Rao, Duraisamy Rajendran, George Dominic, Sellappan Selvaraju. (2016). Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. *Animal Nutrition*, 2, pp 134-141.
- Pinos Rodríguez, Juan M.; González Muñoz, Sergio S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25, pp. 379-385.
- Polin Raygoza, L. A., Muro Reyes, A., Díaz García, L. H. (2014). Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias* pp. 25-47.
- Potencial para mejorar la eficiencia productiva de vacas lecheras lactantes mediante el uso de ionóforos. (1995). *Proc. Maryland Nutr. Conf. para Feed Mfgrs* pp. 90-99.

- Goodrich, RD., Garrett, JE., Gast, DR., Kirick, MA., Larson, DA., Meiske, JC. (1984). Influence of monensin on the performance of cattle. *J. anim. Sci.* ,58, pp. 1484-1498.
- Reynolds, C., K. Aikman, P., C. Lupoli, B. Humphries, D., J. Beaver, D., E. (2003). Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86.
- Sabrina Marc Antonio Coneglian; Román David Castañeda Serrano; Olga Teresa Barreto Cruz; Antonio Ferriani Branco. (2019). Effects of essential oils of cashew and castor on intake, digestibility ruminal fermentation and purine derivatives in beef cattle fed high grain diets semina. *Ciencias Agrarias* 40 2057-2070.
- Sallam, Sobhy M.A.; Abdelgaleil, Samir A. M. (2010). Efecto de diferentes niveles de aceite esencial de cítrico y su componente activo en la fermentación microbiana ruminal y la producción in vitro de metano *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44 pp. 373-378.
- Schäfer, G. Engelhard, M. Müller, V. (1999). Bioenergetics of the Archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, pp. 570-620.
- Nagaraja, TG., Avery, TB., Galitzer, SJ., Harmon, DL. (1985). Effect of ionophore antibiotics on experimentally induced lactic acidosis in cattle. *American Journal of Veterinary Research*. 46 pp. 2444–2452.
- Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. 2a. ed., Ithaca, Ed. Cornell University Press, pp. 476.
- Voelker J.A., Allen M.S. (2003). Pelleted beet pulp substituted for high-moisture com:3. Effects on ruminal fermentation, pH and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 86 pp. 3562-3570.
- Hagerman, AE, Robbins, CT, Weerasuriya, Y., Wilson, TC y McArthur, C. (1992). Tannin chemistry in relation to digestion *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 45 (1), 57-62.
- Terranova, O. M. V., & Campos-Gaona, R. (2014). Use of plant secondary metabolites to reduce ruminal methanogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17(3).
- Hassanat, F., Benchaar, C. (2013). Assessment of the effect of condensed (acacia and fermentation and methane production *in vitro*. *J. Sci. Food Agric.*, 93 pp. 332-339.

- Krueger, W.K., Gutierrez-Bañuelos, H., Carstens, G.E., Min, B.R., Pinchak, W.E., Gomez, R.R., Anderson, R.C., Krueger, N.A., Forbes, T.D.A. (2010). Effects of dietary tannin source on performance, feed efficiency, ruminal fermentation, and carcass and non-carcass traits in steers fed a high-grain diet. *Animal Feed Science and Technology*, 159, pp 1-9.
- Chiquette, J. Cheng, K.-J. Rode, L. M. Milligan. L. P. (1989). Effect of tannin content in two isosynthetic strains of birdsfoot trefoil (*lotus corniculatus* l.) on feed digestibility and rumen fluid composition in sheep. *Canadian Journal of Animal Science*. 69 pp.1031-1039.