



# **BÚSQUEDA DE AGENTES MODULADORES DEL RUMEN A PARTIR DE LA QUIMIOTECA DEL LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

CARLA VALENTINA BONIFACINO BUTTIGLIONE

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Tutoras: Dra. Mercedes González  
Dra. Cecilia Cajarville

Laboratorio de Química Orgánica, Grupo de Química Medicinal-Facultad de Ciencias-Facultad de Química  
Departamento de Nutrición, Facultad de Veterinaria

Montevideo, Uruguay  
2012

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han apoyado a lo largo de la carrera y en la realización de este trabajo:

A Carlos por estar hace 7 años a mi lado, siempre acompañándome, dándome aliento o simplemente estando ahí cada vez que lo necesité.

A mi familia por la educación que me dieron, por su apoyo y por confiar en que yo podía. A mis hermanas Sofía y Silvana por su ayuda constante.

A Mercedes González y Cecilia Cajarville por haberme dado la oportunidad de realizar mi tesis, por haber dedicado su tiempo para enseñarme y por confiar en que yo podía realizar este trabajo.

A Analía Pérez por todo lo que me enseñó, por su ayuda diaria y por la lectura previa de este trabajo.

A los integrantes del departamento de Nutrición Animal y de Bovinos de Facultad de Veterinaria, y a los del Laboratorio de Química Orgánica de Facultad de Ciencias.

Gracias!!!

## TABLA DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE TABLAS Y FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
2.1 Generalidades de la digestión ruminal.....	2
2.2 Ecosistema ruminal .....	2
2.3 Fermentación ruminal.....	3
2.4 Moduladores de la fermentación ruminal.....	5
2.4.1 Monensina como modulador de la fermentación ruminal .....	7
2.5 Evaluación de la actividad fermentativa mediante la técnica de producción de gas <i>in vitro</i> .....	8
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
3.1 Objetivo general.....	10
3.2 Objetivos específicos.....	10
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
4.1 Productos químicos a evaluar .....	11
4.2 Mediciones y cálculos.....	14
4.2.1 Actividad fermentativa mediante la técnica de producción de gas <i>in</i> <i>vitro</i> .....	14
4.2.1.1 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio.....	16
4.2.1.2 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos.....	17
4.2.1.3 Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina.....	17
4.3 Análisis estadístico .....	18
4.4 Estabilidad de los productos químicos.....	19
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
5.1 Producción de gas <i>in vitro</i> .....	19
5.1.1 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio .....	19
5.1.2 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos.....	22
5.1.3 Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina .....	26
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>30</b>
6.1 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio .....	30
6.2 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos .....	31

6.3 Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina.....	34
6.4 Estabilidad de los productos químicos.....	35
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1. Dosis de monensina (Mon).** Volumen de gas de las distintas dosis de monensina (mL)/g MS de heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados y su desvío estándar.....20
- Figura 2. Regresión lineal de la producción potencial de gas (a) según la dosis de monensina (mg)**.....20
- Figura 3. Regresión lineal de la tasa de producción de gas (kd) según la dosis de monensina (mg)**..... 21
- Figura 4. Regresión lineal del tiempo latencia en la producción de gas (Lag) según la dosis de monensina (mg)**.....21
- Figura 5. Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo de los 20 productos evaluados.** Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para los 20 productos a la dosis d.....22
- Figura 6. Producto 10 (P10).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P10 a la dosis d (P10-d), con sus respectivos desvíos estándar.....23
- Figura 7. Producto 18 (P18).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P18 a la dosis d (P18-d), con sus respectivos desvíos estándar.....24
- Figura 8. Producto 19 (P19).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P19 a la dosis d (P19-d), con sus respectivos desvíos estándar.....24
- Figura 9. Producto 14 (P14).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P14 a la dosis d (P14-d), con sus respectivos desvíos estándar.....25

<b>Figura 10. Dosis de monensina (Mon).</b> Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y los duplicados para cada dosis de Mon, con sus respectivos desvíos estándar.....	26
<b>Figura 11. Dosis del Producto 10 (P10).</b> Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P10, con sus respectivos desvíos estándar.....	27
<b>Figura 12. Dosis del Producto 18 (P18).</b> Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P18, con sus respectivos desvíos estándar.....	27
<b>Figura 13. Dosis del Producto 19 (P19).</b> Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P19, con sus respectivos desvíos estándar.....	28
<b>Figura 14. Dosis del Producto 14 (P14).</b> Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P14, con sus respectivos desvíos estándar.....	28
<b>Figura 15. Regresión lineal de la producción potencial de gas (a) de los productos, P10, P18, P19, P14 y Monensina en función de la concentración (mg).....</b>	29
<b>Tabla I. Estructura molecular de los productos a evaluar (P1-P20).....</b>	11
<b>Tabla II. Composición de las soluciones utilizadas.</b> Estudio de estabilidad y en los sistemas de fermentación <i>in vitro</i> .....	14
<b>Tabla III. Dosis de monensina (mg) dentro del sistema de fermentación.....</b>	17
<b>Tabla IV. Dosis de monensina o producto (mg) dentro del sistema de fermentación.....</b>	18

## LISTA DE ABREVIATURAS

**a:** producción potencial de gas  
**aa:** aminoácidos  
**AGV:** ácidos grasos volátiles  
**CH:** carbohidratos  
**d:** dosis  
**DMSO:** dimetil sulfóxido  
**kd:** tasa de producción de gas  
**Lag:** tiempo de latencia en la producción de gas  
**Mon:** monensina  
**mo:** microorganismos  
**MS:** materia seca  
**MSi:** materia seca incubada  
**N:** nitrógeno  
**N-NH<sub>3</sub>:** nitrógeno amoniacal  
**P:** Presión en el interior de los frascos de fermentación  
**P1-20:** productos evaluados  
**psi:** libras por pulgada al cuadrado  
**PM:** proteína microbiana  
**PV:** peso vivo  
**TLC:** cromatografía en capa fina  
**V:** volumen de gas producido a tiempo t

## 1. RESUMEN

El objetivo del trabajo fue identificar compuestos de síntesis pertenecientes a la quimioteca de nuestra propiedad con capacidad potencial para modular la fermentación ruminal. Se evaluaron 20 compuestos, pertenecientes a diferentes familias,  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazinas,  $N^1$ -óxido de indazoles, benzofuroxanos, furoxanos,  $N^1, N^4$ -dióxido de quinoxalina, nitrotiofeno y  $N$ -óxido de 1,2,4-triazina, seleccionados de acuerdo a sus propiedades estructurales y biológicas. Los productos fueron evaluados mediante la técnica de producción de gas *in vitro* utilizando líquido ruminal como inóculo y como referencia la acción del antibiótico monensina. Los datos de producción de gas fueron ajustados al modelo exponencial simple con latencia. Los parámetros fueron analizados por PROC GLM de SAS considerando el efecto del compuesto. El diseño experimental consistió en 2 frascos/compuesto + 3 sin antibiótico (control) + 3 con monensina + 3 blancos, total= 49 frascos. Los compuestos y la monensina fueron evaluados a una dosis de 0,042 mg (dosis d). Todos los productos disminuyeron la producción de gas, los productos P10 (benzofuroxano), P18 (furoxano) y P19 ( $N^1, N^4$ -dióxido de quinoxalina) al igual que la monensina disminuyeron la producción de gas un 9,6% con respecto al control. La monensina presentó el mayor kd, seguido por el control, P19, P10 y P18. El menor Lag lo presentó P10 y el control con un valor medio de 2,0 h, mientras que la monensina, P18 y P19 presentaron un valor medio de 3,1 h. En un segundo ensayo bajo iguales condiciones se evaluó el efecto dosis- respuesta de los productos P10, P18 y P19, se incluyó P14 como control negativo y monensina, las dosis estudiadas fueron 10d, 2d, d, 1/2d, 1/10d. El diseño experimental consistió en 2 frascos/compuesto/dosis + 2 con monensina/dosis + 5 sin antibiótico (control) + 5 blancos, total= 60 frascos. Las medias de todos los parámetros obtenidos fueron comparadas entre sí mediante el test de Tukey. Se observó una correlación lineal negativa entre el volumen de gas y la dosis de los productos P10, P18, P19 y monensina, mientras que para P14 se observó una correlación lineal positiva. Los productos P10 y P18 a las dosis 2d se comportaron como la dosis 1/2d de monensina, mientras que P10 y P18 a dosis 10d se comportaron como la dosis d y 2d de monensina, respectivamente. La menor kd se obtuvo para el control ( $0,052 \text{ h}^{-1}$ ) y el menor Lag se obtuvo para P18-d (2,78 h). No se observó un efecto diferencial en el kd y Lag ni por el producto ni por la dosis. El producto P10 se destacó entre los productos estudiados por presentar similar efecto en la producción de gas, menor tasa de producción y tiempo de latencia más corto que la monensina. Al emplear distintas dosis de cada producto si bien el producto P10 presentó un comportamiento destacable en cuanto a la producción de gas a la dosis 10d, se obtuvieron mejores resultados con P18 a igual dosis por comportarse como la dosis 2d de monensina. Se puede sugerir que una disminución en la producción de gas refleja una fermentación más eficiente, dirigida hacia la formación de AGV en detrimento de la producción de dióxido de carbono e hidrógeno.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### 2.1 Generalidades de la digestión ruminal

El aparato digestivo de los rumiantes se encuentra formado por 4 compartimentos, los primeros tres, retículo, rumen y omaso actúan como cámaras fermentativas y preceden al abomaso o estómago verdadero equivalente al estómago de los monogástricos (Church, 1993). El retículo-rumen es la cámara fermentativa de mayor tamaño y lugar donde ocurre la mayor parte de la digestión del alimento. Una gran población microbiana simbiote le confiere al animal la capacidad de utilizar forrajes como fuentes de energía y de carbono (Jouany y Morgavi, 2007).

La materia orgánica que contienen los forrajes está compuesta en gran parte por polisacáridos estructurales como la celulosa y hemicelulosas, estructuras formadas por polímeros de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta$  1-4. Los rumiantes no poseen enzimas endógenas que hidrolicen estos enlaces, siendo la población bacteriana la responsable de digerir dichos carbohidratos.

El comportamiento ingestivo desarrollado por los rumiantes le permite en una primera instancia disminuir e hidratar el alimento mediante la masticación y posteriormente a través de la rumia se logra disminuir el tamaño de partícula. Esto permite aumentar la superficie expuesta a los microorganismos (mo) y con ello aumentar el aprovechamiento del alimento. Además permite la circulación del alimento desde el rumen al omaso a través del orificio retículo-omasal y por lo tanto hacia la parte posterior del tracto digestivo, en donde ocurrirá la digestión (Wattiaux y Howard, 2003).

### 2.2 Ecosistema ruminal

El desarrollo de una compleja diversidad microbiana que actúa en forma simbiótica le ha permitido a los rumiantes utilizar de forma óptima los polisacáridos estructurales como celulosa y hemicelulosa del forraje ingerido (Jouany y Morgavi, 2007).

La población microbiana incluye bacterias, protozoos, hongos y arqueas (Van Soest, 1994). Dichos mo pueden ser clasificados según su actividad metabólica o en base al sustrato fundamental que degradan, como mo

celulolíticos, hemicelulolíticos, amilolíticos, proteolíticos, entre otros (Ørskov, 1992). Existen otras clasificaciones como la de Cheng et al. (1979) que los categoriza según el estrato que ocupan en el rumen, como: no adheridos a la pared ruminal, no libres en la fase líquida y no adheridos a las partículas de alimento. El 75% de la microbiota ruminal se encuentra adherida a las partículas.

Las bacterias constituyen el grupo de no más numeroso dentro de la microbiota ruminal, su concentración se encuentra en el orden de  $10^{10}$  y  $10^{11}$  bacterias/mL pertenecientes a más de 50 géneros diferentes. Los protozoos están presentes en concentraciones de  $10^5$  y  $10^6$  células/mL de unas 40 especies diferentes. Las arqueas  $10^7$ - $10^9$ /mL, de 7 especies diferentes, y alrededor de 5 especies de hongos ( $10^5$ /mL) (Hespell, 1987; Kamra, 2005). La diversidad microbiana se ve afectada por diferentes factores propios del rumiante y de la dieta que se le suministre (Larue et al., 2005).

Además de su rol fundamental en la digestión del alimento los no producen proteína microbiana (PM), considerada como la fuente principal de proteína para el rumiante, de alto valor biológico y elevada digestibilidad intestinal (Stern et al., 1994; Hoover y Miller, 1996; Dewhurst et al., 2000).

### 2.3 Fermentación ruminal

La degradación de la fibra en el rumen depende de la actividad enzimática de los no y del tiempo que están en contacto o tiempo de retención de la digesta en el rumen (Carro et al., 2000). La degradación ruminal de los carbohidratos (CH) ocurre en dos fases, en la primera son degradados hasta azúcares simples, y en la segunda son absorbidos estos azúcares y metabolizados intracelularmente para producir energía y ácidos grasos volátiles (McDonald et al., 1995).

Los ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta son producidos como desechos del metabolismo bacteriano, generados a partir de la fermentación ruminal de los alimentos y principalmente de CH. Una vez absorbidos a través del rumen son metabolizados en los tejidos, constituyen la mayor parte de la energía utilizada por el animal para su mantenimiento y producción (Voelker y Allen, 2003). Los principales AGV producidos son el acético, propiónico y butírico,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  y ocasionalmente lactato (Van Soest, 1994).

De esta forma la mayor parte de los nutrientes que obtiene el rumiante son producidos en el rumen gracias a la capacidad que le confiere el metabolismo microbiano para convertir la fibra de los alimentos y proteínas

de baja calidad, al igual que el nitrógeno no proteico en nutrientes valiosos para ellos mismos (Jouany y Morgavi, 2007; Dewhurst et al., 2000). Ésto depende de la interacción entre el forraje y los mo ruminales, por lo cual un ambiente ruminal óptimo que favorezca la actividad microbiana podría maximizar dichos procesos (Rearte y Santini, 1989).

El pH representa uno de los principales parámetros que afectan directamente al crecimiento microbiano y, en consecuencia, a la fermentación ruminal. La mayoría de las bacterias del rumen presentan una actividad óptima y un máximo crecimiento cuando el pH ruminal alcanza valores de 6,0 a 6,9 (Van Soest, 1994), no obstante el pH se relaciona directamente con el tipo de mo que predomina en el rumen (Pereira et al., 2007). El tipo de dieta, la frecuencia de alimentación y el nivel de ingesta, entre otros hacen que el pH fluctúe a lo largo del día (Cerrato et al., 2005).

Un segundo factor que actúa sobre los mo es el N amoniacal ( $N-NH_3$ ), debido a que es usado por la mayoría de las bacterias ruminales como fuente de nitrógeno para su crecimiento (Russell, 1996). El  $N-NH_3$  surge como un producto final de la degradación de proteínas, a partir del catabolismo microbiano de aminoácidos (aa), péptidos y sustancias nitrogenadas no proteicas como la urea, obtenida a partir de la dieta o endógena (Russell y Hespell, 1981). Parte de este  $N-NH_3$ , junto con péptidos y aa libres producidos durante su formación, son utilizados por los mo para la síntesis de PM, mientras que el exceso es absorbido a través de las paredes del rumen y transportado, vía portal, al hígado, en donde se transformará en urea. La urea regresa al rumen en donde los mo pueden utilizarla como fuente de N (Tebot et al., 2002).

Una concentración de  $N-NH_3$  en rumen de 5-8 mg/dL puede ser considerada como la concentración mínima necesaria para maximizar la eficiencia de síntesis de PM (Russell y Strobel, 1987; Pereira et al., 2007). Existen diversas opiniones acerca del nivel de  $N-NH_3$  necesario para un óptimo crecimiento microbiano en el rumen. Éste, en general, se produce dentro de un rango de 5-20 mg/dL de  $N-NH_3$ . La concentración de  $N-NH_3$  puede variar con la dieta, hora y frecuencia de alimentación entre otros factores (Joo et al., 2005).

Otro parámetro que describe el ambiente ruminal son los AGV, la concentración total de AGV normalmente varía entre 70-150 mmol/L (McDonald et al., 1995). La proporción en la que estos se encuentran se ve afectada directamente por el tipo de dieta que consume el animal. A pesar de las grandes oscilaciones en la población microbiana y de las diferencias en el consumo de alimentos, las proporciones de los AGV en el rumen, se mantienen en gran medida estables. Sus proporciones son generalmente próximas a 65: 25: 10, para el acetato, propionato y butirato, respectivamente, con dietas a base de forrajes (Church, 1993).

Las condiciones ruminales óptimas para la producción microbiana que no afectan la degradación de los componentes fibrosos de los forrajes se caracterizan por un pH cercano a la neutralidad (6,7-6,8), una concentración de N-NH<sub>3</sub> de al menos 5-8 mg/dL y de AGV de 75-90 mmol/L con una relación acético/propiónico de 3,5/1 (Van Soest, 1994; Kaufmann et al., 1980; Rearte, 1982; Remond et al., 1995). Observándose que si las condiciones ruminales varían se generan cambios en la microbiota ruminal.

Calsamiglia y Ferret (2002) indican que si bien la fermentación de CH no estructurales es energéticamente más eficiente que la fermentación de CH estructurales, los primeros son altamente acidogénicos. Una dieta con elevada inclusión de concentrados en detrimento de forraje conduce a un rápido descenso del pH ruminal generado por la acumulación de AGV, particularmente ácido láctico (Sauvant, 1999). Este ambiente es propenso para la proliferación de bacterias ácido tolerantes como *Streptococcus bovis*, principal responsable de los cuadros de acidosis clínica (Radostits et al., 2002). Grant y Mertens (1992) sugirieron que una abrupta reducción en el pH de 6,2 a 5,8 debida a la fermentación del almidón inhibe las bacterias celulolíticas, disminuyendo de esta forma la tasa de digestión de celulosa y hemicelulosa (Annison et al., 2002).

#### 2.4 Moduladores de la fermentación ruminal

La adición a la dieta del rumiante de diversos compuestos moduladores de la fermentación ruminal se ha centrado en prevenir trastornos digestivos con la acidosis (Krause y Oetzel, 2006). Otros han generado modificaciones en los procesos digestivos y metabólicos del animal, aumentando la eficiencia de utilización de los alimentos (Carro y Ranilla, 2002).

Calsamiglia et al. (2005) plantea que algunos objetivos que se pueden considerar al manipular la fermentación ruminal son: modular el pH ruminal y reducir la acumulación de ácido láctico, disminuyendo de esta forma el riesgo de desarrollo de enfermedades como la acidosis. Mejorar la eficiencia del uso de la energía en rumen a través de la reducción en la síntesis de metano, un producto final de la fermentación ruminal (3-15% de la energía consumida) que no puede ser utilizado por el rumiante y que en consecuencia representa energía que se pierde como resultado de una menor disponibilidad y transferencia de hidrógeno entre bacterias. Otra forma de mejorar el uso de energía es regular la relación ácido acético / ácido propiónico, relación que se encuentra en niveles bajos en condiciones de acidosis e incrementar la digestibilidad ruminal de la materia orgánica y la fibra de los alimentos. Mejorar la eficiencia de uso del nitrógeno ruminal a través de: la reducción de la proteólisis y la desaminación de aa, la inhibición

de la acción de los protozoos, y la facilitación de la sincronía entre energía y proteína a nivel de rumen, como forma de incrementar la síntesis de PM.

Demeyer y Doreau (1999) destacan que manipular las vías de hidrogenación de los ácidos grasos a nivel de rumen, por ejemplo a través de la nutrición, permite modificar la composición de los lípidos en los productos finales como carne y leche con el objetivo de incrementar el contenido de compuestos nutraceuticos como el ácido linoleico.

Dentro de los aditivos moduladores de la fermentación ruminal se destacan las sustancias buffers, en general mantienen el pH ruminal en un rango adecuado para lograr una actividad microbiana óptima. El bicarbonato de sodio es el buffer más empleado en rumiantes (Krause y Oetzel, 2006). Algunas de las alternativas que se encuentran en estudio incluyen extractos vegetales, ácidos orgánicos, probióticos, prebióticos y enzimas exógenas (Calsamiglia et al., 2005).

Durante los últimos años la inclusión en la dieta del rumiante de antibióticos a niveles sub- terapéuticos, han constituido una herramienta efectiva para mejorar el funcionamiento del rumen, reducir las pérdidas de energía y de nutrientes y así aumentar la eficiencia de producción de los rumiantes (Caja et al., 2003). Su empleo también se traduce en mejoras significativas de la ganancia de peso, además de mejorar los parámetros reproductivos y el estado sanitario de los animales (Broderick, 2004).

Los antibióticos más empleados han sido los ionóforos Monensina y Lasalócido (Freer et al., 2007). Su mecanismo de acción (al igual que cualquier ionóforo) se basa en alterar el pasaje de cationes a través de las membranas celulares, a favor de un gradiente eléctrico y en contra de un gradiente homeostático normal (Duffield et al., 2008). Su principal blanco de acción son las bacterias Gram-positivas cuyos principales productos de fermentación son acetato, butirato, hidrógeno y ácido láctico (Calsamiglia et al., 2005). La mayoría de las bacterias Gram-negativas son menos sensibles a los ionóforos (Duffield et al., 2008; McGarvey et al., 2010; Russell y Houlihan, 2003). Dicho efecto radica en la estructura de las bacterias, la membrana externa y la membrana celular formada por múltiples capas de peptidoglicano les confiere a las bacterias Gram-negativas mayor resistencia a los ionóforos. No obstante existen algunas bacterias ruminales de este tipo como *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Ruminococcus flavefaciens* sensibles a la monensina (Rodriguez et al., 2004).

#### 2.4.1 Monensina como modulador de la fermentación ruminal

El antibiótico monensina (ionóforo) ha sido uno de los moduladores ruminales más utilizados en la dieta de los rumiantes ya que posee un amplio espectro de acción. Tiene la propiedad de poder formar complejos liposolubles con iones sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>) en el hospedador y en los microorganismos que habitan el rumen (Rodríguez et al., 2004), de esta forma afecta el desarrollo de la flora normal del rumen. Además se destruye la escasa población de hongos y se produce un barrido total de protozoos (Rodríguez y González, 2000).

Los efectos que se detallan a continuación describen como la monensina impone mejoras en la performance animal y explican su acción terapéutica.

Entre los principales efectos de la utilización de monensina sobre la performance animal se encuentran la disminución en la producción de ácido acético y un aumento en la de ácido propiónico, con capacidad neogluconeogénica. Esto disminuye el consumo de otros precursores, como aminoácidos que podrán ser utilizados para sintetizar proteína corporal. Mediante el aumento de la cantidad de ácido propiónico, la concentración de glucosa aumenta, la que junto con la galactosa forma lactosa, determinando un aumento en el volumen de leche producida (Rodríguez y González, 2000). También disminuye la cantidad de grasa butirosa de la leche debido a la disminución del ácido acético, principal sustrato para su síntesis (Sauer et al., 1998; McGuffey et al., 2001). Inhibe a una gran parte de las bacterias productoras de hidrógeno y dióxido de carbono (Chen y Wolin, 1979). Si bien no inhibe directamente el desarrollo de la flora metanogénica (Henderson et al., 1981) por lo antes mencionado disminuye la producción de gas metano. Además se ha demostrado que la monensina inhibe bacterias proteolíticas, permitiendo que la proteína abandone el rumen sin haber sido degradada, logrando su absorción intestinal (Rodríguez y González, 2000). De igual modo disminuye la producción de amoníaco en el rumen, con lo cual la pérdida de energía destinada a la transformación del mismo en urea disminuye (Broderick, 2004; Russell y Houlihan, 2003).

Adelanta la pubertad en vaquillonas debido a que el ácido propiónico estimula la liberación de Factores Liberadores de Gonadotropinas, los cuales estimulan a nivel de la hipófisis la liberación de la hormona Luteinizante llevando a la aparición de ciclos sexuales (Stahringer et al., 2003).

Con respecto al efecto terapéutico de la monensina se describen tres de los más importantes. Uno de ellos es la reducción de la acidosis por tener afinidad por las bacterias productoras de ácido láctico como *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus*, disminuyendo su población (McGuffey et al., 2001). La disminución en la concentración intraruminal de ácido láctico, produce un

aumento de pH y de esta manera se favorece indirectamente la degradación de la fibra por bacterias fibrolíticas. De igual modo evita el meteorismo generado por una excesiva producción de mucopolisacáridos bacterianos producido por las antes mencionadas. Los mucopolisacáridos incrementan la viscosidad del flujo ruminal, atrapando el gas de fermentación, evitando así su normal eliminación por medio del eructo (Calsamiglia y Ferret, 2002). A su vez disminuye la incidencia de cetosis disminuyendo la cantidad de cuerpos cetónicos como el beta-hidroxibutirato presentes en sangre (McGuffey et al., 2001; Rodríguez y González, 2000).

El aumento de la producción de productos vacunos gracias al uso de monensina hace de este antibiótico un suplemento ideal. Sin embargo en la Unión Europea la presión ejercida por los consumidores y las recomendaciones establecidas en el Libro Blanco de Seguridad Alimentaria (Jiménez, 2006) pusieron en rigor el Artículo 11 del Reglamento 1831/2003 sobre aditivos en la alimentación animal. El mismo establece la prohibición del uso de antibióticos promotores del crecimiento a partir del 1 de enero del año 2006 (Jiménez, 2006; Diario Oficial de la Unión Europea, 2003; Hurtado, 2006). Esta normativa fue concebida para reducir los riesgos de crear resistencias microbianas y preservar la eficacia de ciertos antibióticos de uso humano (Jiménez, 2006). Durante el último tiempo muchos trabajos se han enfocado en la aparición de residuos de monensina en leche indicando que los mismos han generado reacciones alérgicas (Russell y Houlihan, 2003; Busquet et al., 2005).

Esto conlleva a la necesidad de desarrollar nuevos aditivos para la alimentación animal que aseguren niveles de rendimientos comparables a los de la monensina y que no presenten riesgos para la salud del consumidor y del animal, así como la conservación del medio ambiente (Broderick, 2004).

## 2.5 Evaluación de la actividad fermentativa mediante la técnica de producción de gas *in vitro*

Para evaluar el valor nutricional de los alimentos en la producción de rumiantes se pueden realizar métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* (Van Soest, 1994). Entre los métodos *in vitro* se encuentra la técnica de producción de gas la cual, a diferencia de otras técnicas *in vitro* e *in situ*, no sólo determina la cantidad, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado como un producto de la fermentación ruminal (Theodorou et al., 1994; Rymer et al., 2005). López et al. (2007) indican que también puede ser empleada para investigar los mecanismos de la fermentación microbiana, y para estudiar el modo de acción de los factores

anti-nutritivos, aditivos y suplementos alimenticios (López et al., 2007). La técnica se basa en el supuesto de que el gas producido se relaciona directamente con el sustrato fermentado por los mo (López et al., 2007). El proceso implica medir la presión acumulada en los fermentadores (Theodorou et al., 1994) y para ello se han desarrollado metodologías que permiten medir la producción de gas a presión y volumen constante mediante métodos manuales, semiautomáticos o automáticos (Rymer et al., 2005). Theodorou et al. (1994), propuso y desarrolló la técnica para la medición manual de la presión usando un transductor de presión, un ensamble de jeringa/transductor que mide el gas acumulado.

Los principios generales de la técnica son similares a los de otras técnicas *in vitro* empleadas para estimar digestibilidad: uso de sustratos molidos, un medio anaeróbico, un inóculo ruminal e incubación en baño ajustados a 39 °C (Williams, 2000). La diferencia fundamental está en que se mide la producción de gas a intervalos regulares de tiempo y al final de la incubación, esto permite definir la cinética de la fermentación (Williams, 2000).

Esta técnica presenta como principales ventajas, el bienestar animal (se requiere un menor número de animales que empleando técnicas *in vivo*), el tamaño de la muestra, un bajo costo, además de la descripción de la cinética de fermentación (Williams, 2000). La desventaja que presentaría esta técnica sería la falta de uniformidad entre las metodologías, lo cual dificulta la comparación de resultados entre diferentes grupos de investigación.

Rymer et al. (2005) realizaron una revisión en donde evalúan variaciones en la técnica y el impacto que éstas pueden tener, entre ellas estudian el tamaño y la preparación de la muestra, el efecto del inóculo, la composición del medio, la utilización de blancos, los aparatos utilizados, los cambios en la presión atmosférica, el efecto de agitación del medio y la liberación de gas a determinados tiempos de la incubación. Estos autores llegaron a la conclusión de que el factor de mayor importancia en términos de su efecto sobre la técnica es el del inóculo y la actividad microbiana que él posea.

Las curvas de producción de gas pueden ser ajustadas a diferentes modelos matemáticos (Posada y Noguera, 2007). La descripción estadística por modelos matemáticos de las curvas de producción de gas permite la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación (inóculos) y proporciona información sobre las tasas de fermentación de los constituyentes (Noguera et al., 2004). Uno de los modelos más utilizados es el modelo exponencial simple con latencia (Lag).

Para la selección del modelo se toma en cuenta la capacidad de ajuste de los datos obtenidos al mismo, la cual es evaluada a través de herramientas estadísticas. Posada y Noguera (2007) indican que los mejores modelos son aquellos que presentan el mejor balance entre la capacidad de ajuste de los

datos y la coherencia biológica, siendo necesarios su evaluación en las más variadas condiciones experimentales. Para este estudio se utilizó el modelo exponencial simple con Lag, el cual supone que la tasa de producción de gas es constante y que depende del sustrato disponible una vez alcanzado el tiempo de colonización.

Durante la fase inicial ocurre la hidratación y colonización del sustrato insoluble por los microorganismos ruminales. Cuando el sustrato es saturado con microorganismos y enzimas, la fase exponencial toma lugar; durante esta fase la porción más degradable del sustrato insoluble es degradada primero, mientras que el sustrato menos digestible precisa de más tiempo para ser degradado. Finalmente, cuando la fracción potencialmente degradable ha sido fermentada, la producción de gas es cero (Posada y Noguera, 2007).

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 Objetivo general

Identificar compuestos químicos pertenecientes a nuestra quimioteca capaces de modular la fermentación ruminal en forma similar al antibiótico monensina.

#### 3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de monensina para modular la fermentación ruminal *in vitro* para usarlo como control positivo.
2. Evaluar *in vitro* la capacidad moduladora de distintos productos químicos de síntesis.
3. Evaluar *in vitro* los productos que presenten mejor comportamiento mediante ensayos dosis-respuesta.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo a los principios bioéticos y protocolos de supervisión propuestos por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).

### 4.1 Productos químicos a evaluar

El grupo de investigación de Química Medicinal ha desarrollado una quimioteca de más de 1000 productos, pertenecientes a más de 15 familias de compuestos, desarrollados con diversos fines. En este estudio se seleccionaron de esta quimioteca de acuerdo a sus características estructurales y biológicas una serie de 20 productos incluidos en las familias de los  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazinas,  $N^1, N^4$ -dióxido de quinoxalina,  $N^1$ -óxido de indazoles, furoxanos, benzofuroxano, nitrotiofeno y  $N$ -óxido de 1,2,4-triazina. Los productos seleccionados a excepción de P14 poseen en su estructura la función  $N$ -óxido que es biotransformada en medios reductivos, tal como es el ruminal (Boiani et al., 2009; Lavaggi et al., 2008). La estructura molecular y la familia química a la que pertenecen se detallan en Tabla I.

Tabla I. Estructura molecular de los productos a evaluar (P1-P20).

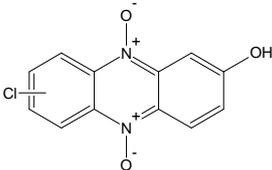
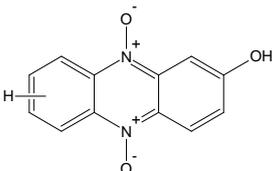
Código	Estructura	Familia
P1		$N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina (Cerecetto et al., 2005)
P2		$N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina (Cerecetto et al., 2005)

Tabla I (Continuación)

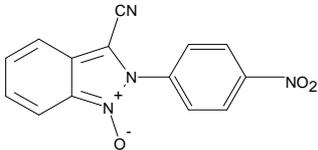
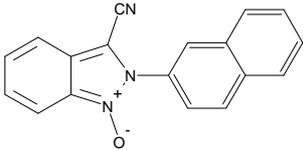
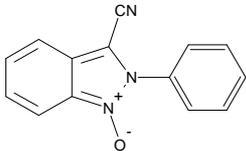
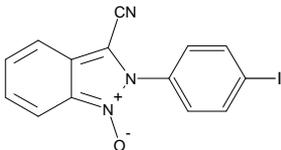
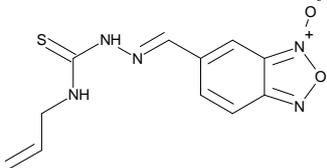
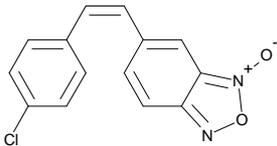
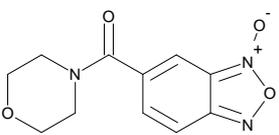
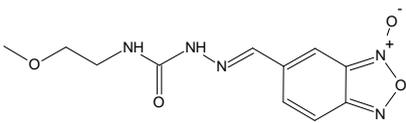
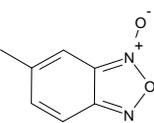
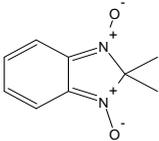
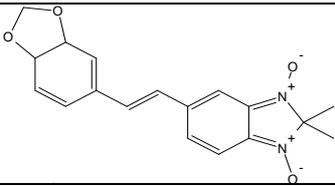
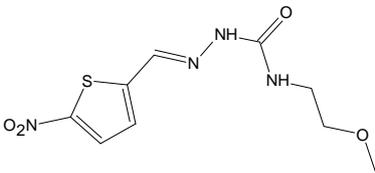
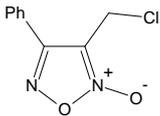
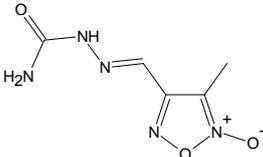
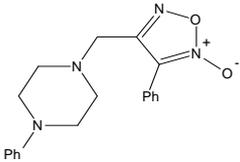
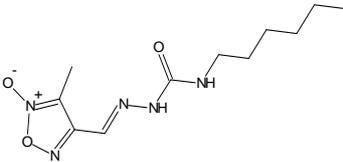
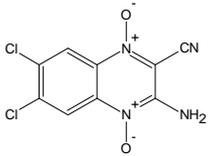
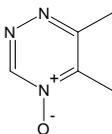
P3		<i>N</i> <sup>1</sup> -óxido de indazol (Gerpe et al., 2006)
P4		<i>N</i> <sup>1</sup> -óxido de indazol (Gerpe et al., 2006)
P5		<i>N</i> <sup>1</sup> -óxido de indazol (Gerpe et al., 2006)
P6		<i>N</i> <sup>1</sup> -óxido de indazol (Gerpe et al., 2006)
P7		Benzofuroxano (Aguirre et al., 2005)
P8		Benzofuroxano (Aguirre et al., 2005)
P9		Benzofuroxano (Aguirre et al., 2005)
P10		Benzofuroxano (Aguirre et al., 2005)
P11		Benzofuroxano (Aguirre et al., 2005)

Tabla I (Continuación)

P12		Benzofuroxano (Boiani et al., 2006)
P13		Benzofuroxano (Boiani et al., 2006)
P14		Nitrotiofeno (Cerecetto et al., 2000)
P15		Furoxano (Cerecetto et al., 1999)
P16		Furoxano (Cerecetto et al., 1999)
P17		Furoxano (Cerecetto et al., 1999)
P18		Furoxano (Cerecetto et al., 1999)
P19		$N^1, N^4$ -dióxido de quinoxalina (Monge et al., 1995)
P20		$N$ -oxido de 1,2,4-triazina (Cerecetto et al., 2004)

## 4.2 Mediciones y cálculos

### 4.2.1 Actividad fermentativa mediante la técnica de producción de gas *in vitro*

La actividad fermentativa se estudió a través de la técnica de producción de gas *in vitro* empleándose el procedimiento descrito por Theodorou et al. (1994) modificado por Mauricio et al. (1999). En todos los casos se utilizaron frascos de 125 mL que contenían 0,5 g de sustrato (seco y molido a un tamaño de 1 mm, se detalla en 4.2.1.1, 4.2.1.2 y 4.2.1.3) con excepción de los frascos destinados a blancos (sin sustrato).

El día previo a la inoculación se le adicionó a cada frasco 38 mL de una solución basal libre de N, 2 mL de una solución buffer y 0,5 mL de una solución reductora, la composición de cada una de las soluciones se detalla en Tabla II (Williams et al., 2005). Inmediatamente después los frascos fueron saturados con una corriente de CO<sub>2</sub> y tapados con tapón de goma siendo almacenados durante toda la noche a 4 °C, con el fin de que el sustrato se hidrate.

**Tabla II. Composición de las soluciones utilizadas.** Estudio de estabilidad y en los sistemas de fermentación *in vitro*.

1) Solución basal (g/L de agua destilada)	
KCl	0,6
NaCl	0,6
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
Solución minerales traza (g/l de HCl 0,02 M) 10 mL por litro de Solución basal	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,020
ZnCl <sub>2</sub>	0,025
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,050
SeO <sub>2</sub>	0,050
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,250
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,250
NaVO <sub>3</sub>	0,031
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,250
Solución hemina (g/L H <sub>2</sub> O destilada hervida con burbujeo de CO <sub>2</sub> ) 10 mL por litro de Solución Basal	
Hemina	0,1 disuelto en una pequeña cantidad de NaOH 0,05 M

Tabla II (Continuación)

2) Solución Reductora (g/L de de H <sub>2</sub> O destilada hervida con burbujeo de CO <sub>2</sub> )	
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	20,5
3) Solución Buffer (g/L de H <sub>2</sub> O destilada hervida con burbujeo de CO <sub>2</sub> , previo al uso 20 min de burbujeo de CO <sub>2</sub> )	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	82,0

A la mañana siguiente los frascos fueron precalentados en un baño termostatzado de acero inoxidable con tapa, hasta alcanzar la temperatura de incubación (39 °C).

Previo a la obtención del inóculo los animales fueron adaptados a la dieta por un período de 7 días. Para estudiar el efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio, los animales se encontraban a pastoreo consumiendo una pastura compuesta por raigrás (*Lolium multiflorum*). En los estudios del efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos y el efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina, los animales fueron alojados en bretes individuales, se les suministró una dieta compuesta por ensilado de planta entera de avena *ad libitum* y grano de sorgo (1% del PV) en una sola dosis a las 8:00 h. De acuerdo al consumo final de los animales, el ensilado representó el 73% y el grano el 27% en base seca de la dieta, siendo el consumo diario promedio de 10.6 kg materia seca (MS) con libre acceso al agua durante todo el diseño experimental.

El inóculo utilizado en los ensayos consistió en una mezcla (partes iguales) de líquido ruminal extraído de dos bovinos machos cruce de las razas Holando y Hereford 440 ± 2 kg de peso vivo (PV) provistos de cánula ruminal. Inmediatamente el líquido ruminal fue transportado al laboratorio en un recipiente térmico precalentado a 39 °C y sometido a un gaseado permanente con CO<sub>2</sub>. En el momento de la inoculación se le agregó a cada frasco 10 mL del inóculo y 0,5 mL de la sustancia en estudio. Las sustancias estudiadas fueron monensina o los productos evaluados ambos en DMSO (disolvente orgánico), las distintas dosis empleadas se detallan en 4.2.1.1, 4.2.1.2 y 4.2.1.3.

Inmediatamente después todos los frascos fueron saturados nuevamente con CO<sub>2</sub>, tapados con tapón de goma y finalmente cerrados herméticamente con precinto de aluminio. Los frascos fueron depositados en el baño termostatzado donde permanecieron todo el período de incubación (96 h) a 39 °C. Para medir la presión en el interior de los frascos de fermentación se utilizó un manómetro digital (Sper Scientific: 840065), unido a una aguja hipodérmica de 0,8 mm.

Luego de cada medición se liberó el gas producido en el interior de los frascos utilizando una aguja hipodérmica. Los frascos fueron agitados y devueltos al baño maría hasta la próxima hora de medición.

Una vez registrada la presión de gas (psi) de cada frasco a los diferentes tiempos, se le restó al gas generado el gas producido por los blancos.

Los datos de presión de gas (psi) fueron transformados a volumen (V) mediante la ecuación de predicción obtenida en un experimento previo:

$$V \text{ (mL)} = 4,40 P \text{ (psi)} + 0,09 P^2 \text{ (psi)}$$

V: Volumen (mL)

P: Presión en el interior de los frascos de fermentación (psi)

A fin de estimar la cinética de fermentación, el volumen de gas producido fue expresado como mL de gas producido por g de MS incubada (MSi).

Los resultados de producción de gas por gramo de MSi se ajustaron al modelo exponencial simple con Lag propuesto por Ørskov et al. (1979):

$$V = a * (1 - e^{-(k_d * (t - \text{Lag}))})$$

V: volumen de gas producido a tiempo t (mL/g MSi)

a: producción potencial de gas (mL/g MSi)

kd: tasa de producción de gas (h<sup>-1</sup>)

Lag: tiempo de latencia en la producción de gas (h)

t: tiempo (h)

Las evaluaciones que se describen a continuación se realizaron siguiendo el procedimiento antes descrito.

#### 4.2.1.1 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio

En este estudio se incubaron 5 blancos (sin sustrato), 3 controles sin monensina conteniendo sustrato y DMSO y tres dosis diferentes de monensina en DMSO, cada una por triplicado (total de frascos= 17). Las dosis estudiadas de monensina fueron 1/2d, d, 2d, siendo la dosis d

proporcional a la recomendada para un bovino adulto. La dosis de monensina dentro del sistema de fermentación se detalla en Tabla III. Como sustrato se empleó heno de alfalfa. La dieta de los bovinos de los que se extrajo el inóculo se describe en 4.2.1. La presión de gas se registró a los tiempos 4, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 h post-inoculación.

**Tabla III. Dosis de monensina (mg) dentro del sistema de fermentación.**

	Monensina		
	1/2d	d*	2d
mg en frasco (51 mL)*	$2,08 \times 10^{-2}$	$4,17 \times 10^{-2}$	$8,33 \times 10^{-2}$

\* Volumen en sistema de fermentación 51 mL= 38 mL solución basal, 2 mL solución de buffer, 0,5 mL solución reductora, 10 mL líquido ruminal, 0,5 mL monensina a la dosis correspondiente. d\*: proporcional a la dosis recomendada para un bovino adulto (Acedo, 1998).

#### 4.2.1.2 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos

Los 20 productos evaluados (Tabla I) fueron estudiados de igual modo. Se incubaron 3 blancos (sin sustrato), tres controles sin monensina conteniendo sustrato y DMSO, 3 con monensina en DMSO a la dosis d y 2 por cada producto a igual dosis, todos en DMSO (total de frascos= 49). Como sustrato se utilizó 0,5 g de una mezcla compuesta por 33% de maíz y 77% de heno de alfalfa, mezclados homogéneamente. La dieta de los bovinos de los que se extrajo el inóculo se describe en 4.2.1. Los tiempos a los que se determinó la presión de gas fueron: 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 h post-inoculación.

#### 4.2.1.3 Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina

En base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se evaluaron los productos que presentaron una cinética de producción de gas similar a la monensina. Además se evaluó un producto que se comportó de forma opuesta a la monensina y de forma similar al control. Su efecto sobre la producción de gas se estudió bajo las mismas condiciones, utilizando los

mismos animales, igual dieta y sustrato. Se incubaron 5 blancos (sin sustrato), 5 controles sin monensina con sustrato y DMSO. La monensina al igual que los productos se analizaron a 5 dosis distintas (cada una por duplicado en DMSO), siendo estas 1/10d, 1/2d, d, 2d, 10d (total de frascos= 60). La dosis dentro del sistema de fermentación se detalla en Tabla IV. Los tiempos a los que se determinó la presión de gas fueron: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 48, 72 y 96 h post-inoculación.

**Tabla IV. Dosis de monensina o producto (mg) dentro del sistema de fermentación.**

	Monensina o producto				
	1/10d	1/2d	d**	2d	10d
mg en frasco (51 mL)*	$4,17 \times 10^{-3}$	$2,09 \times 10^{-2}$	$4,17 \times 10^{-2}$	$8,34 \times 10^{-2}$	$4,17 \times 10^{-1}$

\* Volumen en sistema de fermentación 51 mL= 38 mL solución basal, 2 mL solución de buffer, 0,5 mL solución reductora, 10 mL líquido ruminal, 0,5 mL monensina o producto a la dosis correspondiente. d\*\* : proporcional a la dosis recomendada para un bovino adulto (Acedo, 1998).

#### 4.3 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico de SAS (SAS Institute, Cary, USA, 2000). Todos los parámetros fueron analizados por PROC GLM considerando el efecto del compuesto.

Se realizaron análisis de regresión lineal de los parámetros de producción de gas *in vitro* en función de la dosis de monensina (Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio) y de la dosis de cada producto estudiado y monensina (Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina), empleando la herramienta Linear Fit de Microcal Origin 6.0, se aceptó como tendencia valores de  $R \geq 0,6$ .

Las medias de todos los parámetros obtenidos en la evaluación del efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina fueron comparadas entre sí mediante el test de Tukey.

En todos los casos se aceptaron como diferencias significativas valores de  $P \leq 0,05$ .

#### 4.4 Estabilidad de los productos químicos

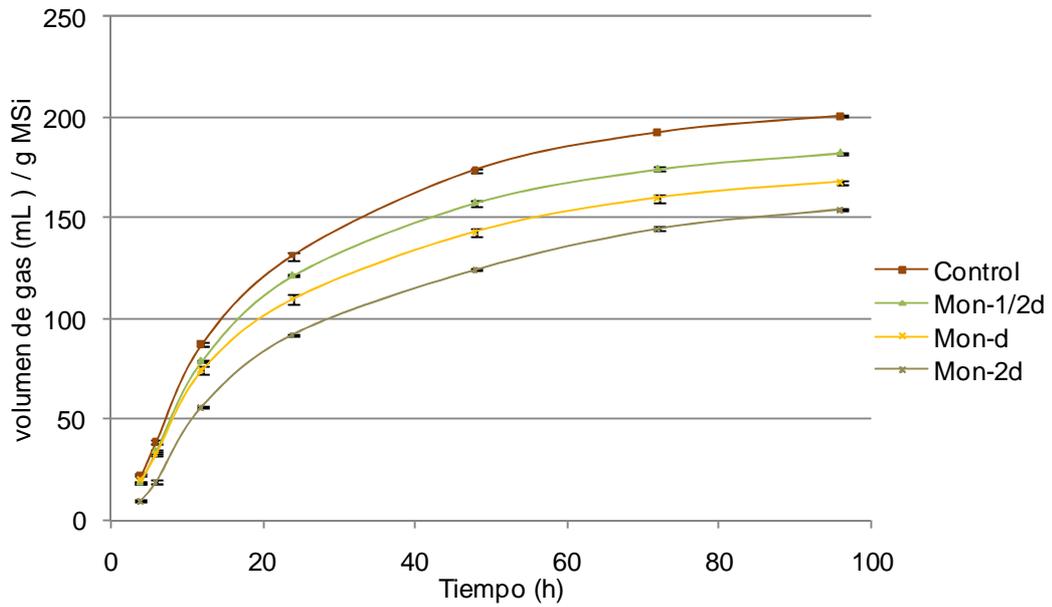
Se estudió la estabilidad de los 20 productos evaluados (Tabla I). Para ello se trabajó bajo las mismas condiciones que la técnica de producción de gas *in vitro* con excepción del agregado del inóculo. Una pequeña cantidad de producto se incubó con 25 µL de DMSO y 1975 µL de medio de incubación compuesto por un 93,8% de una solución basal libre de nitrógeno, 4,9% de una solución de bicarbonato y 1,3% de solución reductora (Tabla II) por un período de 96 h a 39 °C. Una vez transcurrido el tiempo mediante extracción con acetato de etilo se tomaron muestras que junto con el respectivo compuesto en estado puro fueron analizadas mediante cromatografía en capa fina (TLC), revelada con UV.

### **5. RESULTADOS**

#### 5.1 Producción de gas *in vitro*

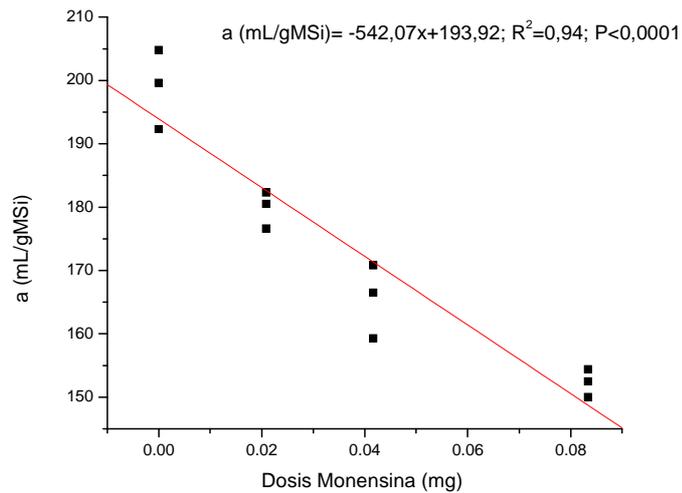
##### 5.1.1 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio

En la Figura 1 se puede observar la dinámica en la producción de gas, evidenciándose que el agregado de monensina al medio de incubación, disminuyó la producción de gas, ( $P < 0.05$ )



**Figura 1. Dosis de monensina (Mon).** Volumen de gas de las distintas dosis de monensina (mL)/g MS de heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados y su desvío estándar.

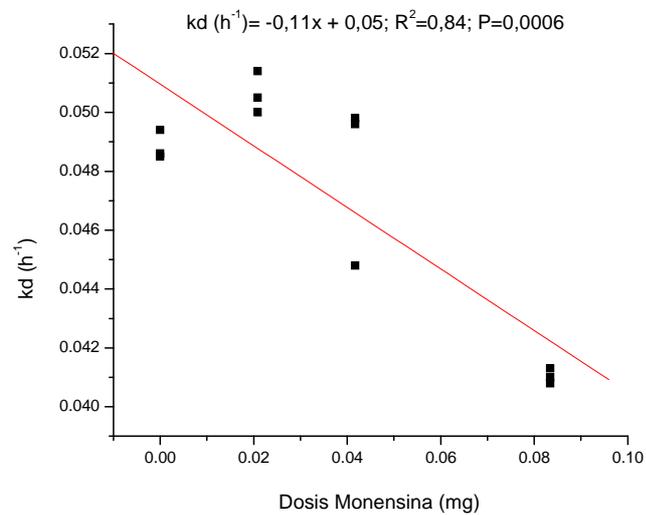
En la Figura 2 se observa que a medida que aumentó la dosis de monensina la producción potencial de gas disminuyó en forma lineal.



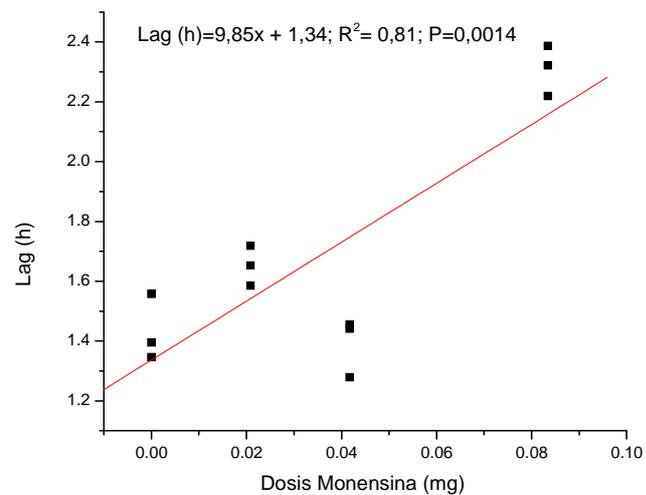
**Figura 2. Regresión lineal de la producción potencial de gas (a) según la dosis de monensina (mg).**

Utilizando la dosis más alta de antibiótico (2d) se obtuvo la menor tasa de producción de gas y el mayor tiempo Lag respecto a las dosis restantes y al control ( $P < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a las medias de los parámetros  $k_d$  y Lag para el control y para las dosis de monensina d y 1/2d ( $P > 0,05$ ). Cuando se evaluó el efecto de la dosis mediante regresión lineal de  $k_d$  y Lag en función de la dosis (mg) de monensina, se observó una correlación lineal negativa de  $k_d$  y una correlación lineal positiva de Lag a medida que aumentó la concentración, Figura 3 y 4 respectivamente.



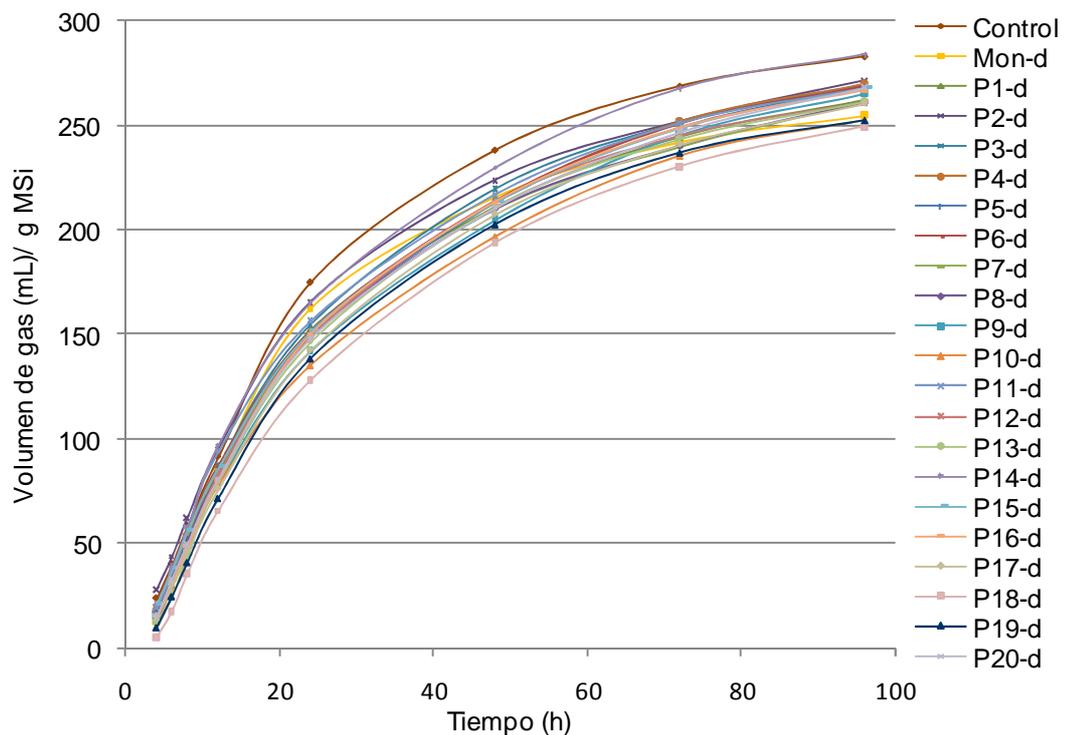
**Figura 3. Regresión lineal de la tasa de producción de gas ( $k_d$ ) según la dosis de monensina (mg).**



**Figura 4. Regresión lineal del tiempo latencia en la producción de gas (Lag) según la dosis de monensina (mg).**

### 5.1.2 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos

En la Figura 5 se describe la dinámica de producción de gas del control junto con los 20 productos evaluados y la monensina a la dosis d.



**Figura 5. Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo de los 20 productos evaluados.** Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para los 20 productos a la dosis d.

El control, presentó la mayor producción potencial de gas y el menor tiempo de latencia.

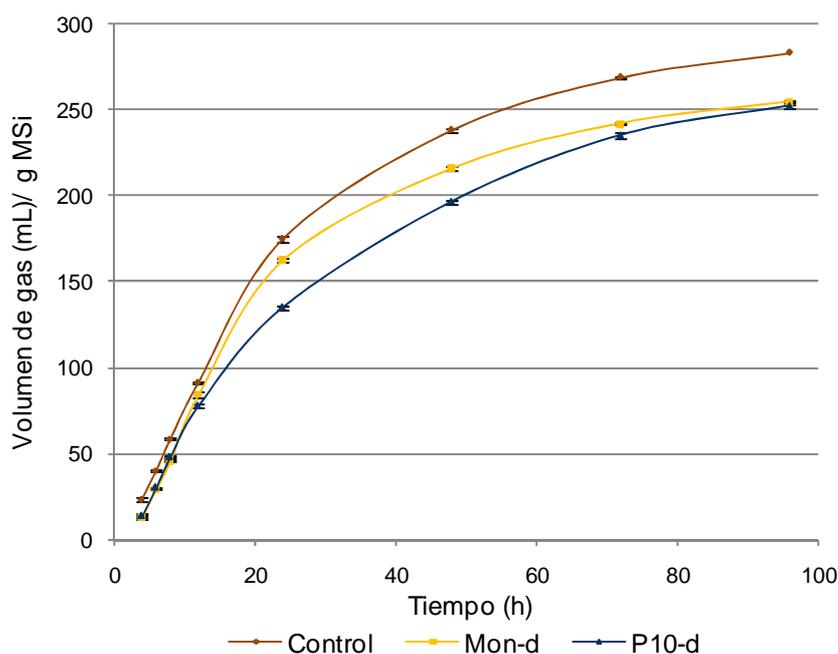
Los productos pertenecientes a las familias de los  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazinas (P1 y P2);  $N^1$ -óxido de indazoles (P3-P6) y  $N$ -óxido de 1,2,4-triazina (P20) si bien afectaron la dinámica de la producción de gas, todos generaron más gas que la monensina ( $P < 0,05$ ).

El producto P10 (benzofuroxano), P18 (furoxano) y P19 ( $N^1, N^4$ -dióxido de quinoxalina) se destacaron por no presentar diferencias significativas con

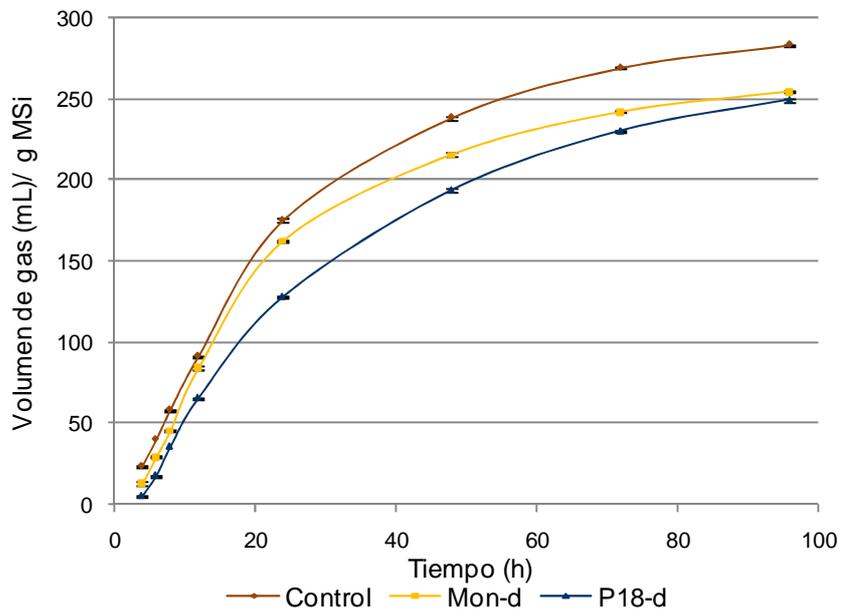
respecto a la monensina ( $P > 0,05$ ). Estos tres productos disminuyeron la producción de gas en el orden del 9,6% con respecto al control. Los restantes benzofuroxanos (P7-P9 y P11-P13) y furoxanos (P15-P17) evaluados disminuyeron la producción de gas, su efecto fue significativamente diferente al de la monensina ( $P < 0,05$ ).

El producto P14 (nitrotiofeno) se destacó por presentar un efecto similar al control ( $P > 0,05$ ).

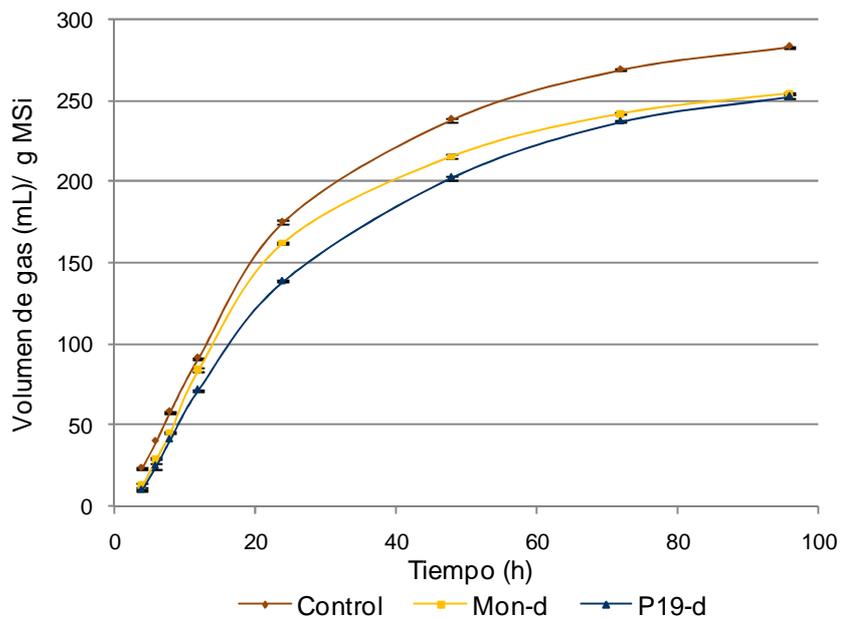
Para observar con mayor claridad el efecto sobre la producción de gas generada por los productos, P10, P18 y P19 se muestran las Figuras 6, 7 y 8 respectivamente. Cada uno de ellos se graficó junto con el control y la monensina a igual dosis (d). En la Figura 9 se describe el efecto del producto P14 sobre la dinámica de producción de gas, observándose que se comporta igual que el control ( $P > 0,05$ ).



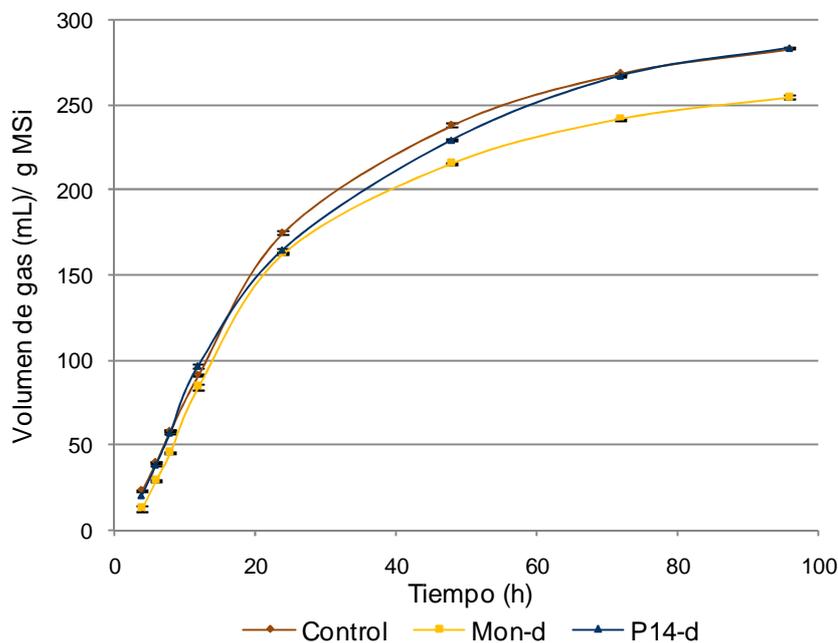
**Figura 6. Producto 10 (P10).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P10 a la dosis d (P10-d), con sus respectivos desvíos estándar.



**Figura 7. Producto 18 (P18).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P18 a la dosis d (P18-d), con sus respectivos desvíos estándar.



**Figura 8. Producto 19 (P19).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P19 a la dosis d (P19-d), con sus respectivos desvíos estándar.



**Figura 9. Producto 14 (P14).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los triplicados para el control y monensina a la dosis d (Mon-d), duplicados para P14 a la dosis d (P14-d), con sus respectivos desvíos estándar.

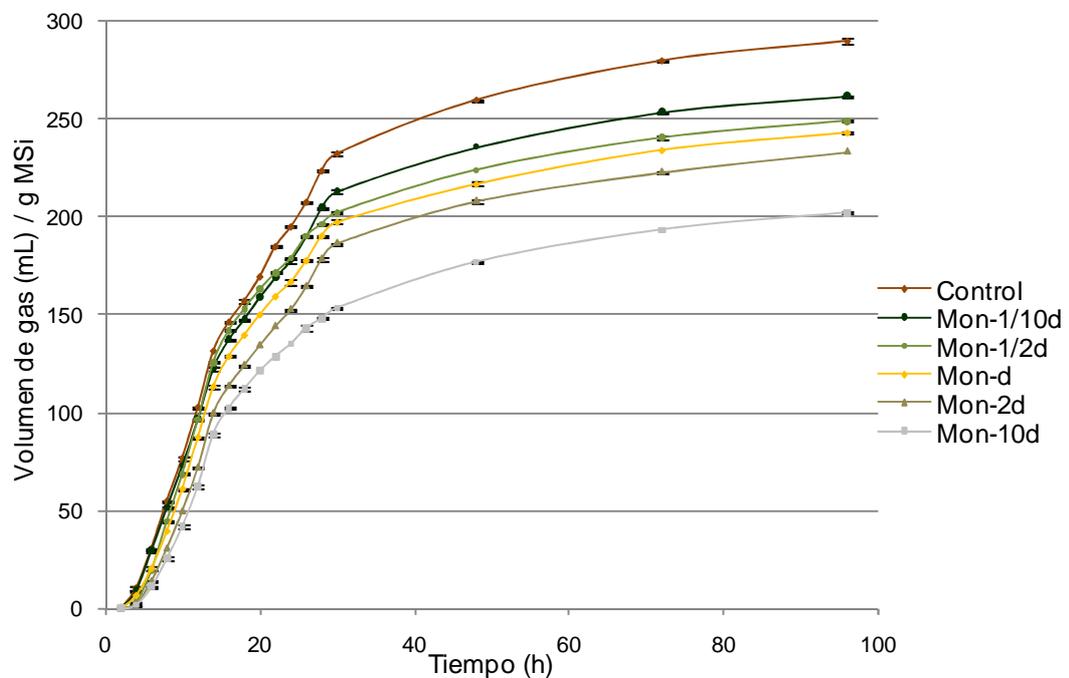
Cuando se comparó estadísticamente el efecto sobre la producción potencial de gas de P10, P18 y P19 versus la monensina estos no presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) con un valor medio de 259,8 mL/gMSi, mientras que con el control sin antibiótico (287,3 mL/gMSi) sí presentaron diferencias ( $P < 0,05$ ).

La tasa de producción de gas disminuyó para los productos P10, P18 y P19 con respecto a la monensina y al control ( $P < 0,05$ ), mientras que el menor tiempo de latencia en la producción de gas se obtuvo para el control y P10 ( $P < 0,05$ ).

Los restantes productos presentaron una producción potencial de gas, tasa y tiempo de latencia significativamente diferente a la monensina ( $P < 0,05$ ). P14 se comportó igual que el control para todos los parámetros estudiados.

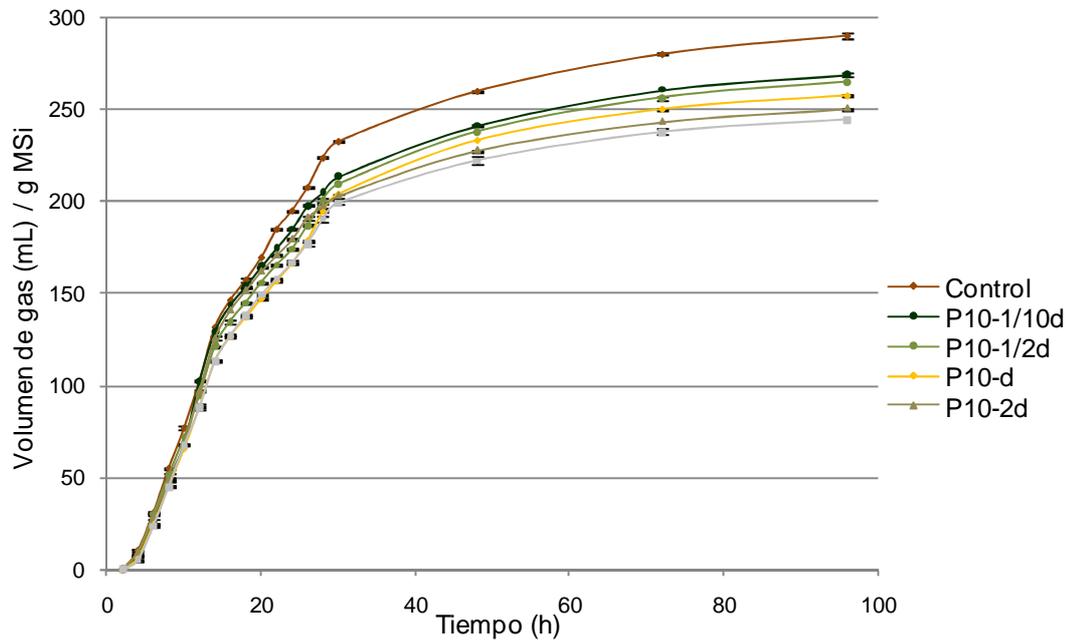
### 5.1.3 Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina

La Figura 10 muestran como se ve modificada la dinámica de producción de gas (mL/gMSi) por la adición de monensina al sistema de fermentación, en donde la dosis más alta (10d) generó una mayor disminución en el volumen de gas, seguida por la dosis 2d, d, 1/2d y 1/10d. Este resultado se corroboró estadísticamente al estudiar el parámetro producción potencial de gas ( $P < 0,05$ ) entre dosis y dosis-control.

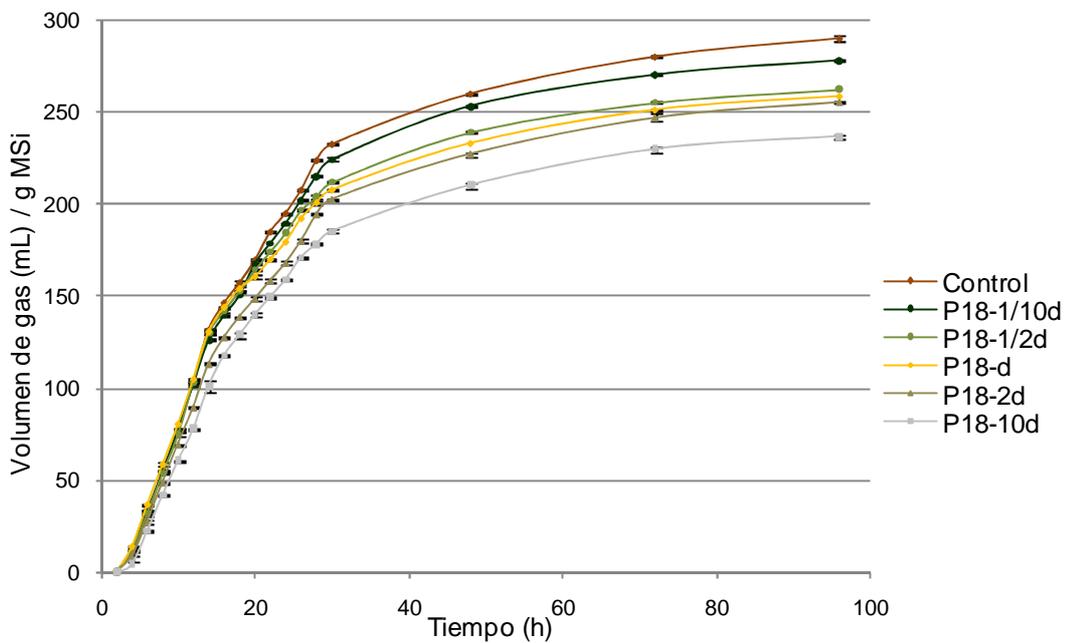


**Figura 10. Dosis de monensina (Mon).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y los duplicados para cada dosis de Mon, con sus respectivos desvíos estándar.

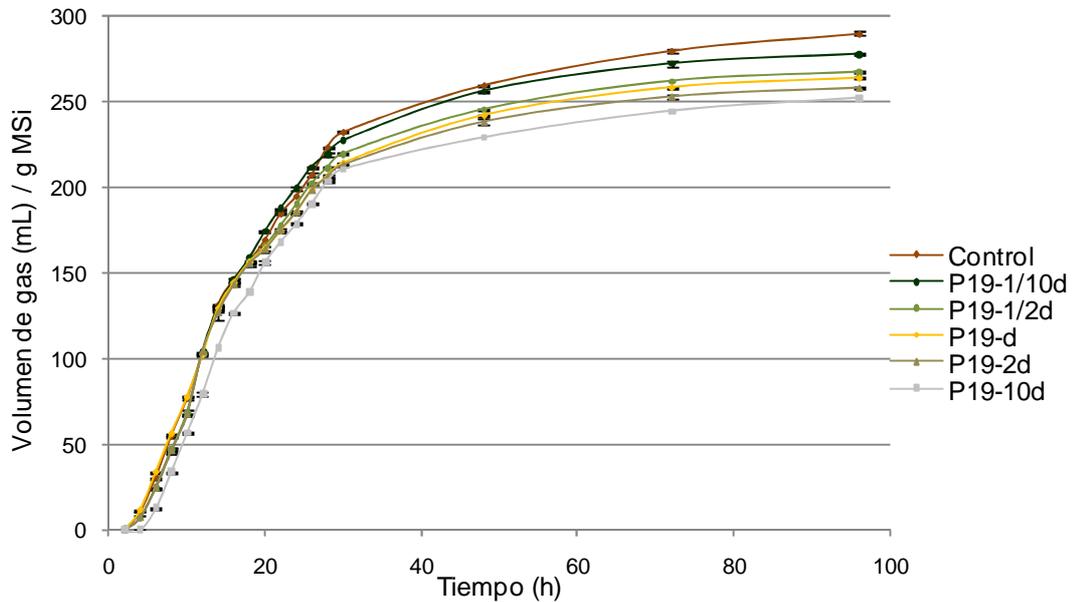
Los productos estudiados presentaron un comportamiento similar a la monensina, P10 (Figura 11) con excepción de las dosis 1/10d y 1/2d ( $P > 0,05$ ), P18 a todas las dosis (Figura 12) y P19 (Figura 13) con excepción de la dosis d, que no presenta diferencias significativas con las dosis 1/2d y 2d ( $P > 0,05$ ).



**Figura 11. Dosis del Producto 10 (P10).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P10, con sus respectivos desvíos estándar.

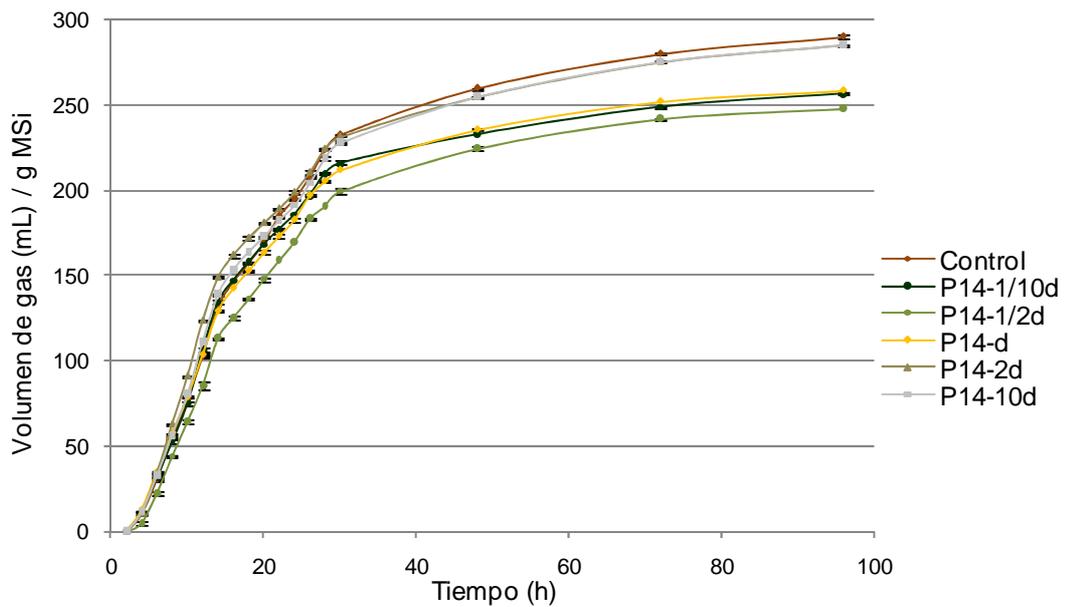


**Figura 12. Dosis del Producto 18 (P18).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P18, con sus respectivos desvíos estándar.



**Figura 13. Dosis del Producto 19 (P19).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P19, con sus respectivos desvíos estándar.

El efecto de P14 sobre la producción de gas se describe en la Figura 14, si bien todas las dosis generaron menor gas que el control ( $P < 0,05$ ) las dosis 2d y 10d produjeron más que las dosis 1/10d, 1/2d y d ( $P < 0,05$ ).

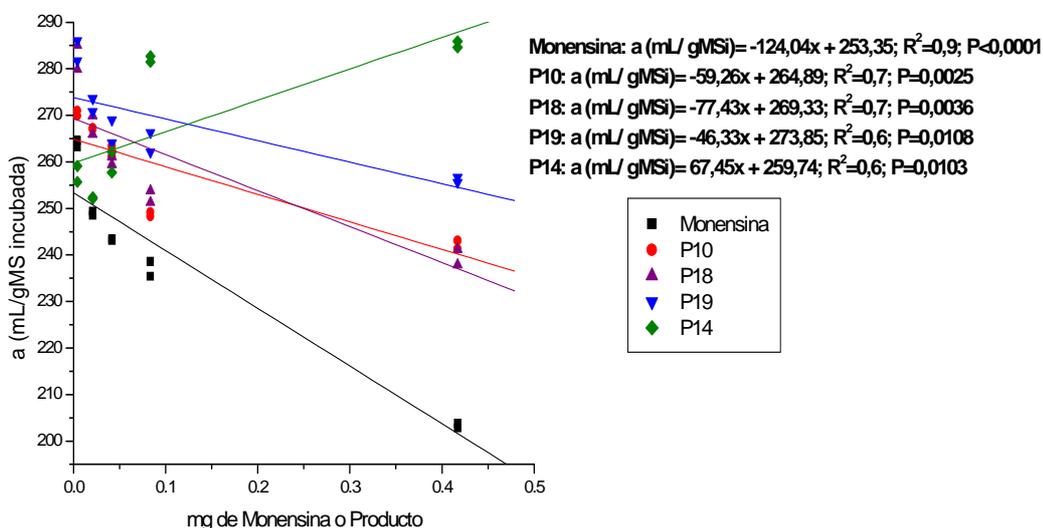


**Figura 14. Dosis del Producto 14 (P14).** Volumen de gas (mL)/g MS de maíz + heno de alfalfa incubada en función del tiempo. Se muestra el promedio de los 5 controles y duplicados para cada dosis de P14, con sus respectivos desvíos estándar.

Cuando se comparó la producción potencial de gas de cada producto a las diferentes dosis con cada una de las dosis de monensina, se observó que P10-2d y P10-10d se comportaron como las dosis 1/2d y d de monensina, respectivamente ( $P>0,05$ ), P18-2d y P18-10d como las dosis 1/2d y 2d de monensina, respectivamente ( $P>0,05$ ). Las dosis que se detallan a continuación se comportaron de forma similar a la dosis 1/10d de la monensina, P10 y P18 a dosis 1/2d y d, P19 a dosis d y 2d ( $P>0,05$ ). Las restantes dosis presentaron una producción de gas significativamente diferente a las dosis de monensina estudiadas.

Al estudiar el efecto de las distintas dosis de P14 se observó que las dosis 1/2d y d se comportaron como las dosis 1/2d y 1/10d de monensina respectivamente ( $P>0,05$ ). Las restantes dosis presentaron una producción de gas significativamente diferente a las dosis de monensina estudiadas.

En la Figura 15 se presentan las curvas de regresión lineal para la producción potencial de gas de las diferentes dosis de cada producto y de monensina. Se observó una correlación lineal negativa entre el volumen de gas y la dosis de los productos P10, P18, P19 y monensina, mientras que para P14 se observó una correlación lineal positiva.



**Figura 15. Regresión lineal de la producción potencial de gas (a) de los productos, P10, P18, P19, P14 y Monensina en función de la concentración (mg).**

La menor kd se obtuvo para el control (0,052 h<sup>-1</sup>). Los productos y la monensina a todas las dosis presentaron un kd más alto o que no presentó diferencias significativas con respecto al control. No se observó un efecto diferencial en el kd ni por el producto ni por la dosis.

Los productos P18-d y P14-d presentaron los menores Lag (2,78 y 2,92 h respectivamente), siendo estos significativamente diferentes al control (3,19 h). No se observó un efecto diferencial en el Lag ni por el producto ni por la dosis.

## **6. DISCUSIÓN**

Existe escasa información que describa el efecto de aditivos moduladores de la fermentación ruminal mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, en particular para los parámetros que se evalúan en este estudio. Como se planteó anteriormente existe gran dificultad al momento de comparar los resultados arrojados mediante esta técnica (Williams, 2000; Rymer et al., 2005), basándose en esta dificultad se trabajó cada evaluación en forma independiente, incluyendo en cada caso los controles necesarios.

### 6.1 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes dosis de Monensina usada como control positivo del estudio

Como se mencionó anteriormente mediante la técnica de producción de gas *in vitro* se pueden cuantificar productos finales de la fermentación ruminal microbiana, entre ellos dióxido de carbono, hidrógeno, metano y ácidos grasos volátiles.

Si bien en este estudio no se determinó la composición del gas generado, como está descrito detalladamente en la literatura el efecto de la monensina, se puede sugerir que una disminución en la producción de gas refleja una fermentación más eficiente, dirigida hacia la formación de AGV en detrimento de la producción de dióxido de carbono e hidrógeno. Esto también se justifica en base al hecho de que la monensina disminuye la población bacteriana productora de hidrógeno y dióxido de carbono (Chen y Wolin, 1979). Por otro lado si bien las especies metanogénicas no se ven inhibidas directamente por el antibiótico (Henderson et al., 1981), la producción de metano se reduce ya que disponen de una menor concentración de hidrógeno necesario para reducir el dióxido de carbono.

Por el contrario, un aumento en la producción de gas reflejaría una fermentación más ineficiente. Por lo cual la disminución en la producción de gas en el orden de un 9,6% que se encontró para las dosis 1/2d, en el orden de 16,8% para d y en el orden de 23,4% para la dosis más alta, en relación al control, se debería a una fermentación más eficiente.

La tasa de producción de gas para la dosis 2d disminuyó un 16,3%, respecto al control, mientras que aumentó un 61,5% el tiempo de latencia. Ésto se podría deber a que una gran parte de la población microbiana simbiote se ve inhibida por el agregado del antibiótico a esta dosis. No obstante esto podría ser beneficioso si se tiene en cuenta el tipo de dieta que consumen los animales en los que se usa monensina, dietas ricas en granos y por lo cual con mayor probabilidad de desarrollar cuadros de acidosis. Por lo cual un compuesto que retarde la fermentación podría ser beneficioso en estos casos.

La dosis recomendada de monensina (d) disminuyó el kd (2,0%) y el Lag (2,8%) mientras que la dosis 1/2d aumentó kd (4,1%) y Lag (15,4%). Si bien estas dosis no generaron diferencias con respecto al control, se observó una clara tendencia a disminuir kd y aumentar Lag de forma lineal a medida que aumentó la concentración de Mon ( $R^2 = 0,84$  y  $0,81$ , respectivamente). De esta manera, incrementando la dosis de Mon, aumentaría el tiempo necesario para la colonización del sustrato (Cheng et al., 1980) proceso clave para la degradación ruminal de los alimentos (McAllister et al., 1994) y disminuiría la cantidad de alimento degradado.

## 6.2 Efecto sobre la actividad fermentativa de diferentes productos químicos

Al comparar los resultados obtenidos para el control (sin antibiótico) con el obtenido para los blancos (sin sustrato) se puede describir el efecto propio del inóculo.

El control, presentó la mayor producción potencial de gas y el menor tiempo de latencia. Estos resultados fueron coherentes con los esperados debido a que no se incluyó en el medio de fermentación ningún aditivo que pudiese modificar el ambiente ruminal.

La producción potencial de gas se afectó en forma diferencial por cada producto evaluado.

Los productos pertenecientes a las familias de los  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina (P1 y P2);  $N^1$ -óxido de indazol (P3-P6) y  $N$ -óxido de 1,2,4-triazina (P20) si

bien afectaron la dinámica de la producción de gas, todos generaron más gas que la monensina resultando no efectivos para este estudio.

El producto P10 perteneciente a la familia de los benzofuroxanos, P18 perteneciente a la furoxanos y P19 perteneciente a los  $N^1, N^4$ -dióxido de quinoxalina se destacaron por no presentar diferencias significativas con respecto a la monensina. Estos tres productos disminuyeron la producción de gas en el orden del 9,6% con respecto al control, por lo cual al igual que en el estudio anterior hace suponer que la fermentación fue más eficiente y/o que disminuyó la producción de otros productos de la fermentación. Los restantes benzofuroxanos (P7-P9 y P11-P13) y furoxanos (P15-P17) evaluados modificaron la producción de gas, pero no de modo comparable con la monensina.

Si bien no se pretende comparar los resultados de este estudio con el anterior se observó una diferencia notoria en la producción potencial de gas obtenida para el control y la monensina. La producción potencial de gas aumentó un 44.4% y 54,0% para el control y monensina respectivamente de un estudio a otro. Esta diferencia podría ser debida a la composición de la dieta suministrada a los bovinos donantes del inóculo y/o a la composición del sustrato (ambos condiciones variaron, ver 4.2.1 dietas y 4.2.1.1 y 4.2.1.2 sustratos).

Lo antes señalado coincide con lo descrito por Sandoval-Castro et al. (2002). Estos autores evaluaron la inclusión de diferentes mezclas de concentrado sobre forrajes de baja calidad empleando la técnica de producción de gas *in vitro* reportando un aumento en la producción de gas cuando se mezcló el forraje con concentrado. Esta diferencia también se observó en un estudio realizado por Britos et al. (2009) los cuales utilizaron como inóculo líquido ruminal proveniente de vaquillonas alimentadas con forraje y diferentes fuentes de carbohidratos. Estos autores observaron que los parámetros de producción de gas *in vitro* se vieron afectados por los diferentes inóculos según la dieta suministrada al bovino.

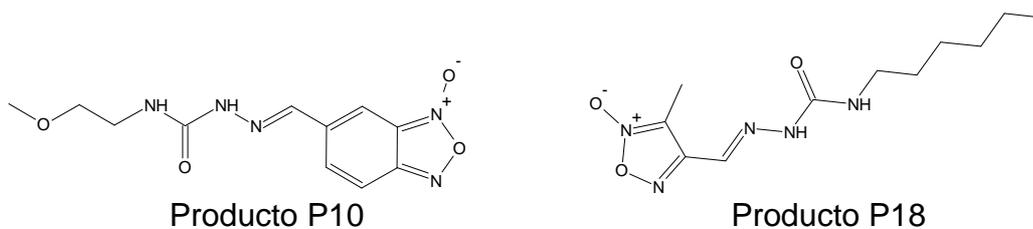
La tasa de producción de gas (kd) disminuyó aproximadamente un 10,0% cuando se trabajó bajo estas condiciones. Arroquy, et al., (2005) evaluaron *in vitro* los efectos de la inclusión de carbohidratos sobre la digestión de fibra de baja calidad, los mismos afirman que la tasa de digestión fue deprimida cuando una fuente de carbohidrato como almidón fue incluida. Asimismo, Grant y Mertens (1992) describieron que la adición de maíz a una dieta de heno de alfalfa (forraje de alta calidad) disminuye el kd. Si bien a los bovinos de los cuales se extrajo el inóculo para este estudio se les suministró sorgo y no maíz ambos son concentrados almidonosos de lenta degradación (Offner et al., 2003) por lo cual se esperó similar efecto.

El agregado de los productos P10 y P18 disminuyeron el kd en el orden de 21,9% y P19 un 14.6%, comparados con el control. Esto indicaría que se enlenteció la degradación ruminal de los alimentos.

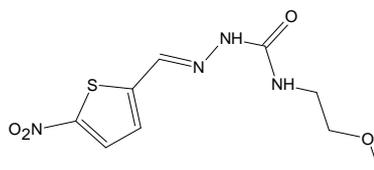
En relación a Lag, P18 y P19 no presentaron diferencias con respecto a la monensina, mientras que P10 al igual que el control disminuyeron el Lag un 35,5%.

Sin embargo, P10 se destacó entre los productos estudiados ya que como se describió anteriormente, presentó similar producción de gas, menor tasa de producción y tiempo de latencia más corto que la monensina.

El efecto de P10 y P18 podría deberse a la combinación en las estructuras de la función *N*-óxido y la cadena lateral semicarbazona que ambos poseen, siendo este agrupamiento químico quien podría estar indicando la actividad de estos productos.



Por el contrario, P14 se comportó, para todos los parámetros, similar al control, por lo cual se puede presumir que no afecta la fermentación ruminal. Dicho efecto podría deberse a que P14 a pesar que posee la misma cadena lateral que P10, semicarbazona, no posee el agrupamiento *N*-óxido sino que es un derivado nitrotiofeno.



Producto P14

Por lo que cabe destacar la importancia de la función *N*-óxido y su combinación con la subestructura semicarbazona.

### 6.3 Efecto dosis-repuesta de la actividad fermentativa para los productos químicos y monensina

El efecto sobre la producción de gas de los 3 productos evaluados a las 5 dosis fue muy diverso.

La evaluación de las 5 dosis de monensina arrojó una marcada diferencia entre dosis. En promedio la producción de gas disminuyó un 9,9%, 15,1%, 17,0%, 19,2% y 30,7% para las dosis 1/10d, 1/2d, d, 2d, 10d respectivamente, en relación al control.

Un estudio realizado por Dennis y Nagaraja (1981) indica que un gran número de bacterias ruminales Gram-positivas y algunas Gram-negativas se ven inhibidas o retardan su crecimiento con el agregado de monensina a niveles de 0,38-12  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que otras Gram-negativas no se ven inhibidas con una concentración de 48  $\mu\text{g/mL}$ . Teniendo en cuenta que las concentraciones de monensina empleadas en el presente estudio fueron 0,42 (1/10d), 2,08 (1/2d), 4,16 (d), 8,33 (2d) y 41,67  $\mu\text{g/mL}$  para las dosis 10d, la disminución en la producción de gas podría deberse a una fermentación más eficiente dirigida hacia la formación de AGV y/o a una menor población de bacterias productoras de hidrógeno y dióxido de carbono con la consiguiente menor producción de metano.

En cuanto a los productos evaluados si bien los mismos presentaron un patrón dosis- respuesta similar a la monensina, la diferencia entre dosis no es tan pronunciada.

El producto P10 a las dosis 1/2d y d disminuyó la producción de gas en un 9,7% con respecto al control, pero sin diferencias significativas con respecto a la dosis 1/10d del antibiótico. P10 a la dosis 2d disminuyó la producción de gas un 15,1% y a la dosis 10d un 17,4% ambas con respecto al control, mientras que no presentan diferencias significativas con las dosis 1/2d y d del antibiótico, por lo cual se puede asumir que poseen un efecto similar sobre la población microbiana que fermenta el sustrato.

El producto P18 a las dosis 1/2d y d disminuyó la producción de gas un 9,9% con respecto al control, pero sin diferencias significativas con respecto a la dosis 1/10d del antibiótico, a la dosis 2d y 10d disminuyó un 13,8% y 18,3% con respecto al control, estos resultados no presentaron diferencias significativas con las dosis 1/2d y 2d de monensina, por lo cual se puede asumir que poseen el mismo efecto, sobre la población microbiana que fermenta el sustrato.

Las dosis d y 2d del producto P19 afectaron la producción de gas en forma similar a la monensina a la dosis 1/10d, siendo las restantes dosis del P19 diferentes de la monensina.

Con relación al efecto de P14 no se encuentra una explicación biológica que justifique que las dosis más altas 2d y 10d en lugar de disminuir la producción de gas la elevaron a valores muy próximos al control con apenas una diferencia del 3,8% y 2,7% respectivamente. Por lo cual se puede asumir que esta desviación en los resultados se puede deber a la formación de un agregado molecular.

Si bien los productos P10, P18 y P19 a todas las dosis presentaron un efecto similar a la monensina al ser adicionados en el sistema de fermentación (disminuyeron la producción de gas al elevar la dosis) es importante destacar a la dosis 10d de P18, la misma se comportó como la dosis 2d de monensina, siendo esta la dosis más alta del antibiótico que fue comparable con la de los productos estudiados.

La tasa y el tiempo de latencia en la producción de gas no arrojaron resultados estadísticamente diferentes a los del control, no se observaron modificaciones en cuanto a la dosis ni producto.

#### 6.4 Estabilidad de los productos químicos

Dado que el estudio de estabilidad se realizó en las mismas condiciones en que fueron evaluados los productos, con la excepción del agregado del inóculo (líquido ruminal) se pudo asegurar que de los 20 productos estudiados, la mayoría, con excepción de P15, P16 y P20, se mantienen inalterados bajo las condiciones de la técnica de producción de gas *in vitro*. Por lo cual, se puede afirmar que el efecto sobre la dinámica de producción de gas se debe a los productos (puros) o a un producto derivado de los mismos generado por el líquido ruminal con el que se inoculó.

### **7. CONCLUSIONES**

La adición de diferentes dosis de monensina a los sistemas de fermentación disminuyó la producción potencial de gas en forma lineal con el aumento de la dosis, empleando como inóculo líquido ruminal extraído de bovinos con dieta forrajera o complementada con un concentrado almidonosos.

El producto P10 se destacó entre los productos estudiados por presentar similar efecto en la producción de gas, menor tasa de producción y tiempo de latencia más corto que la monensina.

Al emplear distintas dosis de cada producto si bien el producto P10 presentó un comportamiento destacable en cuanto a la producción de gas a la dosis 10d (equivalente a 10 veces la dosis recomendada de monensina), se obtuvieron mejores resultados con P18 a igual dosis.

## **8. BIBLIOGRAFÍA**

1. Acedo, J. (1998). Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. XIV Curso de Especialización En: <http://fundacionfedna.org/sites/default/files/98CAPIII.pdf>. (Fecha de consulta: 06/03/2011); p. 47-66.
2. Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Porcal, W., Denicola, A., Möller, M., Thomson, L., Tórtora, V. (2005). Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 13 (23): 6324-6335.
3. Annison E.F., Lindsay D.B., Nolan J.V. (2002). Digestion and metabolism. En: Freer M., Dove H. (Eds.). *Sheep Nutrition*. CAB International, Wallingford, UK; p. 95-118.
4. Arroquy, J.I., Cochran R.C., Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., Jonson, D.E. (2005). Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. *Animal Feed Science and Technology*; 120: 93–106.
5. Boiani, M., Boiani, L., Denicola, A., Torres de Ortiz, S., Serna, E., Vera de Bilbao, N., Sanabria, L., Yaluff, G., Nakayama, H., Rojas de Arias, A., Vega, C., Rolan, M., Gómez-Barrio, A., Cerecetto, H., Gonzalez, M. (2006). 2H-benzimidazole 1,3-dioxide derivatives: a new family of water-soluble anti-trypanosomatid agents. *Journal of Medicinal Chemistry*; 49(11): 3215-3224.
6. Boiani, M., Merlino, A., Gerpe, A., Porcal, W., Croce, F., Depaula, S., Rodríguez, M.A., Cerecetto, H., González, M. (2009). O-Nitroanilines as major metabolic products of anti-Trypanosoma cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans in microsomal and cytosolic fractions of rat hepatocytes and in whole parasitic cells. *Xenobiotica*; 39(3): 236-248.
7. Britos, A., Mendoza, A., Claramunt, M., Karlen, M., Kelly, G., Magallanes, L., Ramirez, S., Zunini, A., Repetto, J.L., Cajarville, C., (2009) Effect of carbohydrate source on rumen fluid pH and in vitro gas production (GP) in heifers fed pasture silage. *Journal of Dairy Science*; 92: 152.

8. Broderick, G.A. (2004). Effect of Low Level Monensin Supplementation on the Production of Dairy Cows Fed Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*; 87: 359–368.
9. Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*; 123–124: 597–613.
10. Caja G., González E., Flores C., Carro M.D., Albanell E. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. XIX Curso de especialización FEDNA: En: [http://www.fundacionfedna.org/publicaciones\\_2003](http://www.fundacionfedna.org/publicaciones_2003) (Fecha de consulta 15/09/2012); p.183-212.
11. Carro M.D., Valdés, C., Ranilla, M.J., González, J.S. (2000). Efecto del nivel de ingestión sobre la cinética de tránsito y la síntesis de proteína microbiana en ovejas alimentadas con raciones con diferente relación forraje: concentrado. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal*; 15: 31-42.
12. Carro M.D., Ranilla M.J. (2002). Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. En: <http://www.produccion-animal.com.ar/> (Fecha de consulta: 19/09/2012); 37:1-6.
13. Calsamiglia, S., Ferret, A. (2002). Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. XVIII Curso de Especialización FEDNA. En: [http://fundacionfedna.org/sites/default/files/02CAP\\_VI.pdf](http://fundacionfedna.org/sites/default/files/02CAP_VI.pdf) (Fecha de consulta 10/08/2012). Barcelona, España, p. 97-115.
14. Calsamiglia, S., Castillejos, L., Busquet, M. (2005). Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. XXI curso de especialización FEDNA. En: [http://fundacionfedna.org/sites/default/files/05CAP\\_VIII.pdf](http://fundacionfedna.org/sites/default/files/05CAP_VIII.pdf) (Fecha de consulta 08/08/2012). Barcelona, España, p. 161-185.
15. Cerrato M., Calsamiglia S., Ferret A. (2005). Efectos del tiempo a pH subóptimo y el número de ciclos sobre la fermentación microbiana ruminal en cultivo continuo. XI Jornadas sobre Producción Animal En: [http://www.aida-itea.org/images/files/jornadas/2005/TOMO%20II%20\(XXI%20jornadas\).pdf](http://www.aida-itea.org/images/files/jornadas/2005/TOMO%20II%20(XXI%20jornadas).pdf) (Fecha de Consulta: 05/09/2012); p. 578-580.

16. Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Risso, M., Saenz, P., Seoane, G., Denicola, A., Peluffo, G., Quijano, C., Olea-Azar, C. (1999). 1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*; 42(11): 1941-50.
17. Cerecetto, H., Di Maio, R., González, M., Risso, M., Sagrera, G., Seoane, G., Denicola, A., Peluffo, G., Quijano, C., Stoppani, A.O., Paulino, M., Olea-Azar, C., Basombrío, M.A. (2000). Synthesis and antitrypanosomal evaluation of E-isomers of 5-nitro-2-furaldehyde and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde semicarbazone derivatives. Structure-activity relationships. *European Journal of Medicinal Chemistry*; Mar; 35(3): 343-350.
18. Cerecetto, H., González, M., Onetto, S., Saenz, P., Ezpeleta, O., De Ceráin, A.L., Monge, A. (2004). 1, 2, 4-Triazine N-oxide derivatives: studies as potential hypoxic cytotoxins. Part II. *Archiv der Pharmazie (Weinheim)*; 337(5): 247-58.
19. Cerecetto, H., González, M., Lavaggi, M.L., Azqueta, A., López de Ceráin, A., Monge, A. (2005). Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*; 48(1): 21-23.
20. Chen, M., Wolin, M.J. (1979). Effect of monensin and lasalocid- sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*; 38: 72-77.
21. Cheng, K.J., McCowan, R.P., Costerton, J.W. (1979). Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 32 (1): 139–148.
22. Cheng, K.J., Fay, J.P., Howarth, R.E., Costerton, J.W., (1980) Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*; 40 (3): 613-625.
23. Church D.C. (1993). *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Zaragoza, Ed. Acribia; p 641.
24. Dennis, M., Nagaraja, T.G. (1981). Effect of Lasalocid or Monensin on Lactate-Producing or Using Rumen Bacteria. *Journal of Animal Science*; 52: 418-426.
25. Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) N<sup>o</sup> 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.

26. Demeyer, D.I., Doreau, M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceeding of the Nutrition Society*; 58: 593-607.
27. Dewhurst R.J., Davues D.R., Merry R.J. (2000). Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*; 85: 1-21.
28. Duffield, T.F., Rabiee, A.R., Lean, I.J. (2008). A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle. Part 1. Metabolic Effects. *Journal of Dairy Science*; 91: 1334–1346.
29. Freer M., Dove H., Nolan J.V. (2007). Feed additives. En: *Nutrient requirements of domesticated ruminants*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia; 231. *Journal of Applied Microbiology*; 51: 159-169.
30. Gerpe, A., Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., Oleazar, C., Rigol, C., Maya, J. D., Morello, A., Piro, O. E., Arán, V.J., Azqueta, A., de Cerán, A.L., Monge, A., Rojas, M.A., Yaluff, G. (2006). Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*; 14 (10): 3467-3480.
31. Grant, R.J., Mertens, D.R. (1992). Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*; 75: 2762-2768.
32. Hespell R.B. (1987). Biotechnology and modifications of the rumen microbial ecosystem. *The Proceeding of the Nutrition Society*; 46: 407-413.
33. Hoover, W.H., Miller, T.K. (1996). Contributions of microbial protein to amino acid supply. En: *Proceeding of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Rochester, NY, USA; p. 199-206.
34. Hurtado, G.A. (2006). Cambios normativos en la Alimentación Animal. *Revista Ganadería*; 6: 38-39.
35. Jiménez, A. (2006). Prohibición del uso de monensina sódica en la alimentación del ganado vacuno: repercusiones y alternativas. *Cría y Salud. Revista de Medicina Veterinaria* n<sup>o</sup>6.
36. Joo, J.W., Bae, G.S., Min, W.K, Choi, H.S., Maeng, W.J., Chung, Y.H., Chang, M.B. (2005). Effect of protein sources on rumen microbial protein synthesis using rumen simulated continuous culture system. *Asian- Australasian Journal of Animal Science*; 18: 326-331.

37. Jouany, J.P., Morgavi, D.P. (2007). Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal*; 1: 1443-1466.
38. Kamra, D. N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Science*; 89: 124-135.
39. Kaufmann, W., Hagemeister, H., Dirksen, G. (1980). Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. In: *Physiology and Metabolism of Ruminants*. Ruckebush and Thivend (eds.) AVI Pousch and Co. Westport, CT; p 587.
40. Krause, K., Oetzel, G. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*; 126: 215-236.
41. Lavaggi, M.L., Cabrera, M., González, M., Cerecetto, H. (2008). Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides. *Chemical Research in Toxicology*; 21(9): 1900-1906.
42. Larue, R., Yu, Z., Parisi, V.A., Egan, A.R., Morrison, M. (2005). Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing. *Environ Microbiology*; 7: 530-43.
43. Lopez, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J. (2007). Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*; 135: 139–156.
44. Mauricio, R.M, Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., Theodorou, M.K. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*; 79: 321-330.
45. McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A., Cheng, K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*; 72: 3004-3018.
46. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (1995). *Animal Nutrition*. 5 Edition. Longman Scientific & Technical. Harlow, England.
47. McGarvey, J.A., Hamilton, S.W., DePeters, E.J., Mitloehner, F.M. (2010). Effect of dietary monensin on the bacterial population structure

- of dairy cattle colonic contents. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 85: 1947–1952.
48. McGuffey, R.K., Richardson, L.F., Wilkinson, J.I.D. (2001). Ionophores for Dairy Cattle: Current Status and Future Outlook. *Journal of Dairy Science*; 84 (E. Suppl.): E194-E203.
49. Monge, A., Martínez-Crespo, F.J., López de Ceráin, A., Palop, J.A., Narro, S., Senador, V., Marín, A., Sainz, Y., González, M., Hamilton, E., Barker, A. (1995). Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides. *Journal of Medicinal Chemistry*; 38(22): 4488-4494
50. Noguera, R.R., Saliba, E.O., Mauricio, R.M. (2004). Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Res for Rural Develop.* 16 (11) En: <http://www.lrrd.org/lrrd16/11/nogu16086.htm> (Fecha de consulta: 22/09/2012).
51. Offner, A., Bach, A., Sauvant, D. (2003) Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*; 106: 81-93.
52. Ørskov, E.R. (1992). *Protein Nutrition in Ruminants*. 2a. ed., Academic Press, New York, USA; p. 51.
53. Pereira, D.H., Gomes, O., Ceolin da Silva, B., Leão, M.I., Valadares, F.S., Martins F.H., Garcia R. (2007). Intake and total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) silage and concentrate in different ratios. *Livestock Science*; 107: 53–61.
54. Posada, S.L., Noguera, R.N. (2007) Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; 20: 141-148.
55. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (2002). *Tratado de las enfermedades del ganado bovino, porcino, caprino y equino*. 9a. ed. McGraw-Hill, Madrid.; 1: 1206
56. Rearte, D.H. (1982). *Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles*. CERBAS-INTA BALCARCE; Buenos Aires, Argentina; p. 94.

57. Rearte, D.H., Santini, F.J., (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Revista Argentina de Producción Animal*; 9: 93.
58. Remond, B., Brugere, H., Poncet, C., Baumont, R. (1995). *Nutrition des Ruminants Domestique*. INRA Paris; p. 253-298.
59. Rodríguez, R., Peralta, C., Ochoteco, M., Picco, E., Litterio, N., y Boggio, J.C. (2004). Posible intoxicación accidental por monensina en terneros destetados. *Veterinaria Argentina*; 21(201): 13-20.
60. Rodríguez, J.M., González, S.S. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en ruminantes. *Interciencia*; 25(8): 379-385.
61. Russell, J.B., Hespell, R.B. (1981). Microbial rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*; 64: 1153-1169.
62. Russell, J.B., Strobel H.J. (1987). Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*; 70: 970-976.
63. Russell, J.B. (1996). Dairy Forage Research Center. Informational Conference with dairy and forage and industries; p. 61.
64. Russell, J.B., Houlihan, A.J. (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*; 27: 65-74.
65. Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*; 123–124: 9–30.
66. Sandoval-Castro, C.A., Capetillo-Leal, C., Cetina-Gongora, R., Ramirez-Aviles, L. (2002). A mixture simplex design to study associative effects with an in vitro gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*; 101: 191–200.
67. Sauer, F.D., Fellner, V., Kinsman, R., Kramer, J.K.G., Jackson, H.A., Lee, A.J., Chen, S. (1998). Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensina or unsaturated fat added to the diet. *Journal of Animal Science*; 76: 906-914.
68. Stahringer, R.C., Balbuena, O., Kucseva, C.D., Arakaki, L.C., Cabarcos, G. (2003). Efecto de la Utilización de Monensina sobre la Aptitud Reproductiva de Vaquillas. En:

<http://www.agrositio.com/vertext/vertext.asp?id=50354&se=1000>  
(Fecha de consulta: 18/09/2012).

69. Stern, M.D., Varga, G.A., Clark, J.H., Firkins, J.L., Huber, J.T., Palmquist, D.L. (1994). Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*; 77: 2762-2786.
70. Sauvant, D. (1999). Influences of feeding level and type of starch on its digestion in cattle. *Sciences des Aliments*; 19: 499–503.
71. Tebot, I., Britos, A., Godeau, J.M., Cirio A. (2002). Microbial protein production determined by urinary allantoin and renal urea sparing in normal and low protein fed Corriedale sheep. *Veterinary Research*; 33: 101–106.
72. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J. (1994). A new gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminal feeds. *Animal Feed Science and Technology*; 48; 185 - 197.
73. Van Soest P.J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2a. ed., Ed. Cornell University Press. Ithaca, New York, USA.
74. Voelker, J.A., Allen, M.S. (2003). Pelleted beet pulp substituted for high-moisture corn:3. Effects on ruminal fermentation, pH and microbial protein efficiency in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 86: 3562-3570.
75. Wattiaux, M.A., Howard, W.T. (2003). *Digestion in the dairy cow*. Babcock Institute for International Dairy Research and Development. University of Wisconsin-Madison. En: [http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/en/de\\_01.en.pdf](http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/de/en/de_01.en.pdf) (Fecha de consulta: 20/09/2012). p. 3
76. Williams, B.A. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axford, R.F.E (editors). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International; p. 189-213.
77. Williams, B., Bosch, M., Boer, H., Verstegen, M., Tamminga, S. (2005). An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Animal Feed Science and Technology*; 123–124: 445–462.