

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**FERMENTACIÓN RUMINAL DE NOVILLOS EN TERMINACIÓN A CORRAL  
ADICIONANDO A LA DIETA ANAVRIN®, MONENSINA O AMBOS**

**“por”**

Luis CASARIEGO  
Guillermo CASTRO  
Gonzalo FITIPALDI

**TESIS DE GRADO** presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias

**Orientación:** Higiene, Inspección - Control y  
Tecnología de los Alimentos

**MODALIDAD:** Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2023**

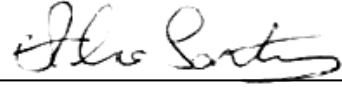
**PÁGINA DE APROBACIÓN**

**Presidente de mesa:**



Gonzalo Fernández Turren

**Segundo miembro (Tutor):**



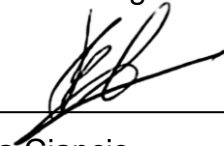
Alvaro Santana

**Tercer miembro:**



Francisco Diéguez

**Cuarto miembro:**



Eliana Ciancio

**Quinto miembro**

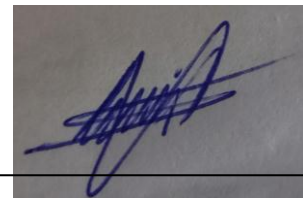


Cecilia Cajarville

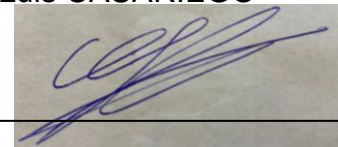
**Fecha de aprobación:**

24 de Agosto de 2023

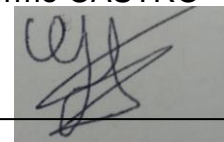
**Autores:**



Luis CASARIEGO



Guillermo CASTRO



Gonzalo FITIPALDI

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos a nuestros padres por habernos brindado la posibilidad de estudiar esta carrera. A nuestras familias y amigos por darnos su apoyo durante todos estos años, sobre todo frente a los desafíos más importantes. A nuestros compañeros por todos los buenos momentos compartidos, por los materiales y las interminables horas de estudio. A profesores, profesionales, en especial a los que nos brindaron su experiencia de vida, siendo imprescindible para nuestra formación y a los que nos ayudaron a sortear obstáculos y superarnos.

Por último y no menos importante a nuestro tutor Dr. Álvaro Santana, y co-tutor Dra. Eliana Ciancio; también a José Luis Repetto y Cecilia Cajarville por permitirnos ser parte de este experimento.

Además, a los Br. y compañeros del ensayo. Alexander Brochini, Juan Pablo Capucho, Matías Diez, Juan Diego Fiandra, Laura González, Dermidio Hernández, Emanuel Longueira, María José Ricci y Soledad de Souza por su ayuda brindada en la realización práctica del trabajo experimental. También agradecer a Juan Dayuto, Jenifer Madera y funcionarios del Instituto de Producción Animal Veterinaria (IPAV) del campo experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, por su trabajo, colaboración y dedicación durante el ensayo experimental.

## TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
2.1 Monensina .....	9
2.2 Aditivos Fitogénicos.....	11
2.2.1 Aceites Esenciales .....	12
2.2.2 Taninos.....	12
2.2.3 Flavonoides .....	13
2.2.4 Anavrin® y efectos asociativos.....	14
3. HIPÓTESIS.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1 Objetivo general .....	15
4.2 Objetivos específicos.....	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Diseño experimental, tratamientos, instalaciones y manejo de los animales .....	15
5.2 Toma de muestras y determinaciones.....	17
5.3 Análisis estadístico .....	18
6. RESULTADOS.....	19
7. DISCUSIÓN.....	22
7.1 Efecto individual con cada aditivo.....	22
7.2 Efecto de ambos aditivos combinados .....	23
8. CONCLUSIÓN .....	24
9. BIBLIOGRAFÍA .....	25

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes de AV, principales principios activos de cada uno y su clasificación.....	16
Cuadro 2. Composición química de la ración totalmente mezclada (RTM) e ingredientes utilizados. Valores expresados como % de la MS salvo que se indique otra cosa (DE entre paréntesis).....	17
Cuadro 3. Parámetros de fermentación ruminal de novillos consumiendo una RTM adicionada con AV, MON o ambos.....	19

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efecto de la Monensina en el flujo de iones en <i>S. bovis</i> (Russell, 1987)...	10
Figura 2. Evolución de la concentración total de AGVs de novillos alimentados con una dieta de terminación adicionada con AV, MON o ambos.....	20
Figura 3. Evolución de la concentración de ácido acético de novillos alimentados con una dieta de terminación adicionada con AV, MON o ambos.....	21
Figura 4. Evolución de la concentración de ácido butírico de novillos alimentados con una dieta de terminación adicionada con AV, MON o ambos.....	21

## RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue comparar el efecto sobre la fermentación ruminal de novillos en engorde, consumiendo una ración totalmente mezclada (RTM) adicionada con Anavrin® (AV), Monensina (MON) o ambos aditivos combinados. Para ello, 12 novillos ( $23 \pm 3$  meses; y  $441 \pm 33$  kg PV) de raza carnífera británica, bloqueados según su peso vivo (PV) y edad, fueron distribuidos aleatoriamente en tres tratamientos dietéticos ( $n = 4$  novillos por tratamiento). En los tres tratamientos, la RTM se ofreció individualmente a cada novillo y la asignación diaria en materia seca (MS) fue equivalente al 2,8% de su PV. Los tratamientos fueron: 1) 0,35 g de AV por 100 kg de PV "AV"; 2) 0,033 g de MON por cada kg de MS "MON" y 3) AV+MON a la misma dosis que en los tratamientos anteriores "AV+MON". La duración total del experimento fue de 60 días y se tomaron muestras de líquido ruminal de cada novillo los días 19, 33 y 47, 8 veces al día. El pH se midió inmediatamente después de la extracción, se tomó 1 ml de líquido ruminal para determinar la concentración de N-NH<sub>3</sub> y 1 ml para determinar la concentración de AGV, los cuales se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis. No se observó efecto de los tratamientos sobre el pH ruminal ni la concentración de N-NH<sub>3</sub>. Para estas variables se detectó un efecto del tiempo de muestreo, pero no hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo de medición. La concentración total promedio de AGV no difirió entre tratamientos, pero hubo una interacción entre el tratamiento y el tiempo de medición. La concentración mM de ácido butírico fue menor en el tratamiento AV+MON ( $p = 0,011$ ; SEM = 1,77) en comparación con MON, presentando AV valores intermedios que no difirieron de los otros dos tratamientos. Hubo interacción entre el tratamiento y el tiempo de muestreo para la concentración de ácido acético y ácido butírico ( $p = 0,050$ ; SEM=5.39) y ( $p = 0,010$  SEM=1.77) respectivamente. A diferencia de los otros dos tratamientos en AV+MON, la concentración de AGV totales, ácido acético y butírico no aumentó entre las 17:00 y las 21:00 horas. La proporción molar de ácido propiónico tendió a ser mayor en AV+MON ( $p = 0,061$ ; SEM= 3,27) en comparación con AV, aunque la relación acético/propiónico no difirió entre los tres tratamientos. La adición de AV o MON por separado no mostró diferencias en el pH, la concentración de N-NH<sub>3</sub> y los AGV. Sin embargo, la adición simultánea de ambos aditivos disminuyó la concentración de ácido butírico y modificó la dinámica diaria de la concentración total de AGV.

## SUMMARY

The objective of this experiment was to compare the effect on ruminal fermentation of steers finishing in the pen, consuming a totally mixed ration (RTM) added with Anavrin® (AV) (a mixture of flavonoids, tannins and essential oils), Monensin (MON) or both additives combined. For this, 12 steers ( $23 \pm 3$  months; and  $441 \pm 33$  kg LW) of the British beef breed, blocked according to live weight (LW) and age, were randomly distributed in three feeding treatments (N = 4 steers per treatment). In the three treatments, the RTM was offered individually to each steer and the daily allowance in dry matter (DM) was equivalent to 2.8 % of its LW. The treatments were: 1) RTM added with 0.35 g of AV for every 100 kg of LW "RTM+AV"; 2) RTM added with 0.033 g of MON for each kg of DM "RTM+MON" and 3) RTM added with AV and MON at the same dose as in the previous treatments "RTM+AV+MON". The total duration of the experiment was 60 d, comprising 19 d of adaptation, where on days 19, 33 and 47 rumen fluid was extracted from each cannulated animal. Once rumen fluid was extracted from each cannulated animal, the pH was measured immediately. Then 1 ml of liquid was taken to determine the concentration of N-NH<sub>3</sub> and 1 ml to determine the concentration of AGVs. All samples were stored at -20 °C until further analysis. No effect of the treatments on ruminal pH or N-NH<sub>3</sub> concentration was observed. For these variables, an effect of the sampling time was detected, but there was no interaction between the treatment and the measurement time. The mean total concentration of VFAs did not differ between the treatments, but there was an interaction between the treatment and the time of measurement. The mM concentration and also the molar proportion of butyric acid was higher in the RTM+MON treatment compared to RTM+AV+MON, presenting RTM+AV intermediate values that did not differ from the other two treatments. There was an interaction between the treatment and the sampling time for the concentration of acetic acid and butyric acid. Unlike the other two treatments in RTM+AV+MON, the concentration of total AGVs, acetic and butyric acid did not increase between 5:00 p.m. and 9:00 p.m. The propionic acid molar ratio tended to be higher in RTM+AV+MON compared to RTM+AV, although the acetic/propionic ratio did not differ between the three treatments. Adding AV or MON separately did not show differences in pH, N-NH<sub>3</sub> concentration, and AGVs; however, its simultaneous addition decreased the concentration of butyric acid and modified the daily dynamics of the total concentration of VFAs.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de carne bovina en confinamiento o estabulada es común en Norteamérica, Europa del Este y la Comunidad de Estados Independientes y representaba en 2016 aproximadamente el 12 % de la producción mundial de carne vacuna (Seré & Steinfeld, 1996). Según el decreto N° 178/010 (MGAP, 2010) los establecimientos de engorde a corral se definen como “establecimientos que mantienen sus animales confinados en espacios reducidos, no teniendo acceso a pastoreo directo y voluntario, y utilizan una alimentación en base a productos formulados (balanceados, granos, núcleos minerales u otros productos), para su terminación con destino directo a faena”. La utilización del engorde o terminación de bovinos a corral a nivel nacional se ha incrementado del 7 % del total de bovinos faenados en 2013 al 13 % en 2021 (Bervejillo, 2021). Este incremento de la cantidad de animales terminados a corral obedece principalmente a dos factores: la mayor intensificación de la ganadería para competir con otros rubros como la agricultura y/o la lechería y la existencia de cuotas de mercado internacional (i.e. 481, etc) con requerimientos específicos de terminación de los animales. Además, la alimentación de animales a corral en combinación con el sistema pastoril permite aumentar la carga, la producción individual de los animales y permite el uso de granos y subproductos de la industria agrícola (Cedrés & Cunha, 2013).

Las dietas utilizadas en el engorde a corral se caracterizan por tener una alta proporción de concentrados energéticos 65 a 90% de la materia seca (MS), para lograr concentraciones energéticas que permitan depositar tejido adiposo en periodos de tiempo relativamente cortos. Por ejemplo, la dieta de animales para ingresar a la cuota 481 debe estar constituida por no menos del 62 % de concentrados y/o coproductos de cereales y contener más de 2.9 Megacalorías de Energía Metabolizable (EM) por kilogramo de MS (Comisión Europea, 2012). Los parámetros claves de eficiencia productiva en estos sistemas de engorde a corral son la ganancia media diaria (GMD) de peso vivo (PV) y la eficiencia de conversión alimenticia (ECA), la GMD suele estar en el rango de 1 a 1,5 kg / día y las tasas de conversión alimenticia son de aproximadamente 8 a 10 kg de MS por kg de aumento de PV.

La continua intensificación de la producción de rumiantes conduce a la expansión de componentes y aditivos para alimentos que se utilizan para cubrir la demanda de nutrientes de los animales. 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, García, Flores, Carro & Albanell, 2003). En los últimos años, los estudios se centran en la investigación de cómo los aditivos alimentarios afectan el microbioma del sistema digestivo para obtener un mejor rendimiento y/o reducir las emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) de los rumiantes (Michalak et al, 2021). Los beneficios del uso de antimicrobianos en la producción de rumiantes descritos anteriormente están bien documentados, sin embargo, existe una preferencia creciente por la carne libre de antimicrobianos debido a los riesgos globales asociados con la resistencia a los antimicrobianos (Odongo et al., 2007). Aumentando la importancia y la cantidad de trabajos de investigación sobre aditivos alimentarios alternativos (i.e. probióticos y prebióticos) a



los antibióticos, que sean seguros para las personas e inoos para el medio ambiente (Michalak et al., 2021). En esta tesis se estudiará el uso de un producto comercial "Anavrin®" actualmente disponible en el mercado, el cual es un aditivo elaborado en base a aceites esenciales (AE), taninos (TN) y flavonoides (FV).

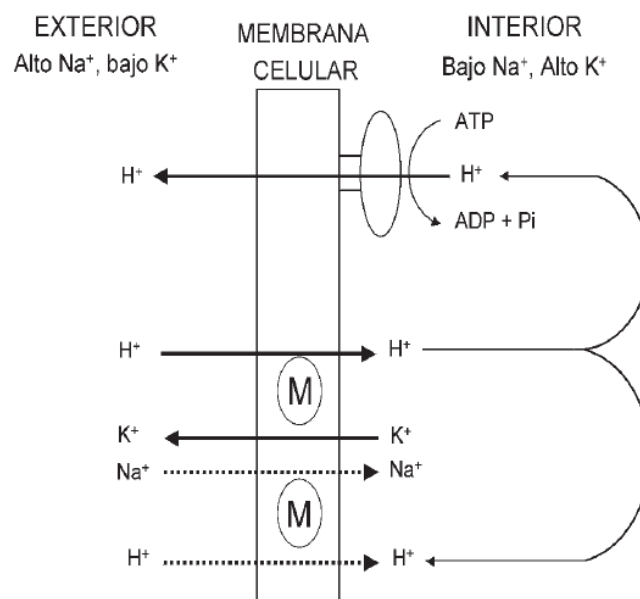
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Monensina

Los antibióticos promotores del crecimiento (APC) son aditivos utilizados en la alimentación animal para modificar los procesos digestivos y metabólicos de los animales, con el fin de aumentar la eficiencia de utilización de los alimentos y mejorar la producción. Los APC más utilizados en sistemas comerciales para producción de carne y leche bovina han sido los ionóforos y particularmente la Monensina (MON) y el Lasalócido (Freer et al., 2007). La MON es un ionóforo de poliéter carboxílico producido por una cepa natural de *Streptomyces cinnamomensis* (Haney & Hoehn, 1967). Adicionar MON a dosis sub terapéuticas (o como APC) en la dieta para mejorar la ECA, es una estrategia nutricional ampliamente utilizada en los sistemas intensivos de producción de carne, y particularmente en la etapa de terminación o engorde (Bretschneider, 2009).

Algunos de los procesos metabólicos modificados por los APC son la excreción de nitrógeno, la eficiencia de las reacciones de fosforilación en las células y la síntesis proteica. La MON inhibe selectivamente las bacterias Gram positivas (G+) debido a las características estructurales de su pared celular, su mecanismo de acción se relaciona con la alteración del transporte de iones a través de las membranas celulares, causando la muerte bacteriana (Russell & Strobel 1989). La MON además de facilitar el intercambio  $H^+$  y  $Na^+$  a través de las membranas celulares, también facilita el intercambio de  $K^+$  y  $H^+$  y el flujo de iones, lo cual ocasiona la salida considerable de  $K^+$ , acumulación de  $H^+$  y disminución del pH. Una vez que el pH intracelular es invertido, la MON provoca la salida de  $H^+$  y la entrada de  $Na^+$ . Como se mencionó anteriormente, estos mecanismos gastan energía (ATP) para expulsar el exceso intracelular de  $H^+$ , por lo que la energía disponible para el metabolismo y crecimiento bacteriano se reduce considerablemente (Russell, 1987)

**Figura 1.** Efecto de la Monensina en el flujo de iones en *S. bovis* (Russell, 1987).



Efecto de la monensina (M) en el flujo de iones en *S. bovis* (Russell, 1987).

Los efectos de adicionar MON en la dieta sobre la fermentación ruminal son diversos y dependen de la dosis suministrada. Generalmente cuando se utiliza como APC (a dosis bajas) disminuye la producción de  $\text{CH}_4$ , de ácido láctico, la degradación proteica y de aminoácidos (Russell & Strobel 1989). Los cambios provocados por los ionóforos en la proporción de ácidos grasos volátiles (AGV) incluyen más ácido propiónico y succinato, y menos ácido acético y ácido butírico (Rodríguez & Muñoz, 2000). Existe un cambio en la población bacteriana de G+ a Gram negativas (G-), de forma concomitante la producción de ácido acético hacia ácido propiónico (Chen & Wolín, 1979). Generalmente estos cambios producen un aumento de la eficiencia del metabolismo energético y del N en el rumen y/o en el animal (Carro & Ranilla, 2002). Contribuyendo también a disminuir la prevalencia de trastornos digestivos como el meteorismo y la acidosis (Schelling, 1984).

La mayor desventaja de utilizar APC es que la resistencia de los patógenos a los antibióticos utilizados en la producción animal o en la medicina humana es motivo de gran preocupación en entornos clínicos y seguirá siendo importante en el futuro (Doyle & Erickson, 2006). Las preocupaciones específicas incluyen el aumento del riesgo potencial de fracaso de los antibióticos humanos en el tratamiento de infecciones, una mayor gravedad de la enfermedad causada por patógenos resistentes a los antibióticos y la posibilidad de selección de genes de mayor virulencia (Sofos, 2008). Según la declaración de la Organización Mundial de la Salud, a pesar que los antimicrobianos han sido una herramienta vital para el tratamiento y control de infecciones bacterianas en humanos, las consecuencias de la resistencia a los antimicrobianos en la salud pública son enormes y ampliamente discutidas (Gatica & Rojas, 2018). En este sentido, el informe de la FAO sobre las

perspectivas del mercado mundial de carnes en 2030 expresa “Si bien los beneficios técnicos del uso de antimicrobianos en la producción animal están bien documentados, existe una preferencia creciente de los consumidores por la carne libre de antimicrobianos debido a los riesgos globales asociados con la resistencia a los antimicrobianos, esto puede afectar a los mercados mundiales de carne, aunque a más largo plazo” (Odongo et al., 2007). Los APC han sido ampliamente utilizados en el pasado como reguladores de la microbiota, sin embargo, su uso como aditivos para la alimentación de los animales está prohibido en la UE desde 2006 (Nehme et al., 2021). Debido al riesgo de generación de bacterias resistentes que posteriormente pueden ser diseminadas hacia la población humana, otros animales o el medio ambiente (Gatica & Rojas, 2018).

## 2.2 Aditivos Fitogénicos

Debido a los beneficios productivos y las restricciones por aspectos de salud pública que tiene el uso de los APC, existe una búsqueda continua de aditivos alimentarios innovadores que puedan servir como alternativas a los antibióticos y que sean seguros tanto para las personas como para el medio ambiente (Michalak et al., 2021). En la última década se ha intensificado la investigación sobre el posible uso de plantas medicinales y sus derivados como aditivos alternativos a los antibióticos, para mejorar la eficiencia digestiva de los alimentos, así como el bienestar y el rendimiento productivo de los animales. Este ha sido un tema de investigación prioritario para la Unión Europea, teniendo como principal objetivo el descubrimiento de especies vegetales o aditivos fitogénicos con los que fuese posible modificar la fermentación ruminal para obtener determinados efectos, tales como la reducción del número de protozoos, la inhibición de la proteólisis o la disminución de la de formación de CH<sub>4</sub>. El interés de dichos efectos es indudable por sus beneficios económicos y medioambientales (Bodas et al., 2007).

Los aditivos fitogénicos son productos naturales, normalmente considerados como seguros. Se trata de un grupo de compuestos extremadamente heterogéneo en relación con su composición y el nivel de sustancias activas, y donde la interpretación de los datos de eficacia se complica con frecuencia cuando las actividades biológicas son atribuidas a más de un componente. En este grupo se incluyen plantas aromáticas y hierbas, extractos de plantas (fito extractos) y de sus ácidos volátiles conocidos normalmente como AE. Sin embargo, a diferencia de otros aditivos, la mayoría de los fitogénicos no están basados en entidades químicas definidas, sino que incluyen múltiples principios activos que interactúan entre sí y es necesaria más investigación sobre sus efectos, su modo de acción y el control de calidad para su estandarización (Ravidran, 2011).

### 2.2.1 Aceites Esenciales

Los AE son compuestos volátiles y aromáticos que se pueden extraer de las plantas mediante métodos de destilación, en particular la destilación al vapor (Greathead 2003). Los AE contienen metabolitos vegetales como terpenos y compuestos fenólicos, con funciones de proteger a la planta de la depredación, la competencia con otras plantas y generalmente presentan actividad antimicrobiana (Carrasco et al., 2020). Los terpenos (e.j. monoterpenos y sesquiterpenos) y los compuestos fenólicos (e.j. fenilpropanoides y fenilpropenos) se originan en diferentes precursores y se sintetizan a través de rutas metabólicas separadas. Los terpenos y fenoles desarrollan su acción contra las bacterias, especialmente las G+ a través de la interacción con la membrana celular, esta actividad se debe a la naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos cíclicos, lo que les permite interactuar con las membranas celulares y acumularse en la bicapa lipídica de las bacterias, ocupando un espacio entre las cadenas de ácidos grasos. Esta interacción provoca cambios conformacionales en la estructura de la membrana, la pérdida de estabilidad, fuga de iones y disminuye el gradiente iónico (Calsamiglia, Busquet., Cardozo, Castillejos & Ferret, 2007). Además, algunos principios activos presentes en los AE como los compuestos fenólicos, pueden afectar bacterias G- al penetrar y dañar la membrana bacteriana, así como también disminuir el desarrollo de hongos y protozoos provocando una coagulación del material citoplasmático, al interactuar con grupos moleculares activos como proteínas y enzimas (Michalak et al., 2021).

Los AE también pueden afectar la degradación y el metabolismo de las proteínas del alimento en el rumen al reducir las reacciones de desaminación de los aminoácidos, lo que reduce la producción de amoníaco. En este sentido, los AE podrían inhibir selectivamente la proliferación de bacterias productoras de hiperamoníaco, responsables de estas reacciones (Nehme et al 2021).

### 2.2.2 Taninos

Son compuestos fenólicos de naturaleza compleja que están presentes en una gran variedad de plantas, en concentración variable. Poseen uno o más anillos aromáticos, grupos carboxilos y oxidrilos libres, los cuales reaccionan entre ellos y con otros compuestos químicos, como por ejemplo las proteínas (Makkar, 2003). Se clasifican en 3 grupos principales: TN hidrolizables, estos son polialcoholes hidrolizables por agentes químicos o por enzimas y están constituidos por un núcleo compuesto por un glúcido, cuyos grupos hidroxilos se encuentran esterificados en ácidos fenólicos (McLeod, 1974; Haslam, 1994), TN condensados (denominados proantocianidinas) y florotaninos (Huang, Liu, Zhao, Hu & Wang 2018).

Suministrados en la dieta de rumiantes los TN afectan la fermentación ruminal, por la acción que ejercen sobre las bacterias del rumen y sobre las proteínas del alimento. Los TN actúan reduciendo el crecimiento bacteriano y la actividad de enzimas proteolíticas bacterianas, mediante la formación de complejos con proteínas de la membrana bacteriana y las enzimas extracelulares que estas secretan (Min, Barry, Attwood, & McNabb, 2003). Estos complejos están unidos por enlaces con máxima estabilidad en el rango de pH 4-7 (Jones & Mangan, 1977). La disminución de la proteólisis, sumado a que los TN (principalmente TN condensados) se unen mediante enlaces covalentes a las proteínas del alimento, disminuyen la degradabilidad ruminal de las materias nitrogenadas del alimento, la concentración de  $N-NH_3$  en el rumen y las pérdidas urinarias de N (Kariuki & Norton, 2008; Pozo, Kozloski, Cuffia, Repetto & Cajarville, 2022). En consecuencia, la adición de TN en la dieta aumenta la proporción de proteína no degradada en el rumen (o pasante), pero que posteriormente a la hidrólisis enzimática en el abomaso, (aproximadamente a pH 2,5) o por enzimas pancreáticas, (aproximadamente a pH 8-9) (Jones & Mangan, 1977). puede ser absorbida en el intestino delgado (Min, Attwood, McNabb, Molan & Barry, 2005). Sin embargo, su actividad es dosis dependiente y en dosis altas pueden reducir la digestibilidad de las proteínas y otros nutrientes, disminuir la fermentación microbiana en el rumen, e inhibir la actividad de las enzimas digestivas endógenas (Wang, Waghorn, Barry & Shelton 1994).

Por último, la adición de TN en la dieta de rumiantes contribuye a disminuir el riesgo de acidosis y la producción de  $CH_4$ , favoreciendo el aumento de la producción de carne, debido a sus propiedades antimicrobianas y su efecto sobre el metabolismo del N descritos anteriormente (Fraga et al., 2020).

### **2.2.3 Flavonoides**

Los FV son metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas, están compuestos por una red de 15 carbonos, los cuales consisten de dos anillos fenil (anillo A, derivado de la cadena polipeptídica, anillo B, derivado del ácido shikímico) conectado por un tercer anillo (C) correspondiente a la parte alquílica del fenilpropano (Winkel Shirley, 2002). Constan de varias subclases, flavonoides (quercetina, kaempferol, miricetina), flavonas (luteolina y apigenina), flavanonas (naringenina), antocianinas e isoflavonoides (genisteína), (Kaçar D, 2008).

Kaçar D (2008): Detección de algunas especies de plantas por sus actividades antioxidantes y antimicrobianas totales. Tesis de maestría. Escuela de Graduados de Ingeniería y Ciencias del Instituto de Tecnología de izmir, izmir. Son comunes en frutas, verduras, nueces y semillas y han sido objeto de investigación médica (Middleton, Kandaswami & Theoharides, 2000) porque tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas (Harborne & Williams, 2000). Los efectos de los FV en la fermentación ruminal han sido objeto de experimentos in vitro (Broudiscou & Lassalas, 2000; Yaghoubi, Gh & Satari, 2007). Cuando se probaron mezclas de FV vegetales en un sistema de cultivo ruminal continuo, los FV

modificaron las condiciones de fermentación (pH, proporción de ácido propiónico y degradación de proteínas) aunque los resultados no fueron homogéneos (Broudiscou, Papon & Broudiscou, 1999; Broudiscou & Lassalas, 2000). Los FV y los ácidos fenólicos tienen efectos antimicrobianos, en particular sobre bacterias Gram positivas en lugar de Gram negativas. Por lo tanto, estas sustancias podrían modificar la fermentación ruminal de manera similar a los antibióticos ionóforos. (Mirzoeva, Grishanin, & Calder, 1997)

## **2.2.4 Anavrin® y efectos asociativos**

El aditivo fitogenético Anavrin® es un producto comercial actualmente disponible en el mercado, elaborado en base a AE, TN y FV (Vetos Europe Sagl, Cadenazzo TI – Svizzera).

En un trabajo previo utilizando 5 g / animal / d de este producto adicionado en una dieta para novillos en terminación, se reportó un aumento de 80 g / d en la GMD y una mejor ECA, respecto a un tratamiento control sin aditivos (Grossi, Trevisan, Compiani & Sgoifo Rossi, 2021). En vacas lecheras dosificadas con 10g / animal / d del producto, aumentó el CMS, la producción y la ECA a leche mejoró un 7.2% comparado a un control sin aditivos (Rossi, Grossi, Dell'Anno, Compiani & Rossi L, 2022). Estos efectos in vivo sobre en la producción, el CMS y la eficiencia alimenticia, se han relacionado con el aumento in vitro de la concentración de ácido propiónico, la disminución de ácido acético, y la menor producción de CH<sub>4</sub> con este aditivo comparado a un control sin aditivo (Grossi et al., 2021; Rossi et al., 2022). La inclusión de este aditivo en una dosis equivalente a 1,65 g / vaca / día, tuvo un efecto in vitro sobre la concentración de AGVs, y la disminución de la producción de gas, similar a la adición de 0,2 g / vaca / día de MON (Viégas, comunicación personal).

## **3. HIPÓTESIS**

En una dieta RTM para novillos en terminación, la fermentación ruminal no diferirá con respecto a la adición de Monensina o Anavrin por separado, pero se modificará al adicionarlos en conjunto debido a sus diferentes mecanismos de acción.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la fermentación ruminal de novillos alimentados con una RTM adicionada con Anavrin®, Monensina o ambos.

### 4.2 Objetivos específicos

Evaluar el pH ruminal, la concentración de ácido acético, propiónico, butírico y N-NH<sub>3</sub> en novillos alimentados con una RTM adicionada con Anavrin®, Monensina o ambos durante la etapa de terminación.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Diseño experimental, tratamientos, instalaciones y manejo de los animales

El trabajo de campo se realizó en el Instituto de Producción Animal Veterinaria (IPAV) en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, ubicado en Ruta 1, km 42,5, Libertad, San José. El manejo y procedimientos experimentales que involucran a los animales se realizaron de acuerdo con las normas que rigen el uso de animales en experimentación, educación e investigación establecidas por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República (Protocolo: 1198 / 2021). Previo a comenzar el experimento los novillos se adaptaron a las rutinas básicas de alimentación y el pesaje, fueron desparasitados y vacunados contra enfermedades respiratorias y clostridiales.

Se utilizaron 12 novillos de raza carnífera británica, equipados con una sonda ruminal semi permanente (K227 Koler, sondas de drenaje torácico, 150 cm de largo, 13,5 mm de diámetro exterior). En un diseño de bloques al azar, los animales fueron bloqueados por peso y edad y distribuidos al azar en tres tratamientos alimenticios (N / tratamiento = 4). Los tratamientos evaluados fueron: 1) RTM adicionada con 0,35 g de AV por cada 100 kg de PV “**AV**”; 2) RTM adicionada con 0,033 g de MON por cada kg de MS “**MON**” y 3) RTM adicionada con AV y MON a igual dosis que los tratamientos anteriores “**AV+MON**”, en todos los casos las dosis utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante. En la totalidad de los tratamientos la asignación

diaria de RTM a cada novillo fue equivalente en MS al 2.8 % de su PV por las siguientes razones: Asegurarnos el consumo total de los aditivos incorporados en el alimento, Calcular la correcta dosis de MON, Evitar distintas cantidades consumidas por cada animal y posibles diferencias en los resultados no debiéndose a los aditivos. La asignación de RTM, la dosis de AV y la dosis de MON se ajustó individualmente cada 12 días luego de determinar el PV de los animales.

Aditivos utilizados:

Monensina sódica (Rumensin<sup>TM</sup> 100, Elanco Animal Health, São Paulo, SP, Brazil)

Anavrin<sup>®</sup> un aditivo fitogénico (Vetos Europe Sagl, Cadenazzo TI – Svizzera) compuesto por la mezcla de: 1 parte de AE (principalmente de: clavo de olor [*Syzygium aromaticum*], semilla de cilantro [*Coriandrum sativum*] y geranio [*Pelargonium cucullatum*]), 2,5 partes de TN de castañas (*Castanea sativa*) y 0,1 parte de bioflavonoides de aceitunas (*Olea europaea*).

**Cuadro 1.** Componentes de AV, principales principios activos de cada uno y su clasificación.

Compuesto	Origen	Principio activo	Concentración relativa <sup>1</sup>	Clasificación química
Aceite esencial	clavo de olor ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	Eugenol	85 a 96	fenilpropanoide
		β-Cariofileno	9 a 15	sesquiterpeno
		α-humuleno	1 a 3	
	semilla de cilantro ( <i>Coriandrum sativum</i> )	Linalool	65 a 78	mono terpeno
		Limoneno	18 a 25	
		Geraniol	13	mono terpeno
		γ-eudesmol	11	sesquiterpeno
geranio ( <i>Pelargonium cucullatum</i> )	Bergamoteno	10		
	Tronolol	9	mono terpeno	
	Taninos	-	taninos hidrolizables	
Bioflavonoides	aceitunas ( <i>Olea europaea</i> )	Flavonoides	-	flavonas, flavonoles, flavanonas

<sup>1</sup>Como % del total de principio activos aislados en cada aceite esencial

La duración total del experimento fue de 60 días, comprendiendo 19 días de adaptación, tres periodos de mediciones con una separación de 14 días entre periodos y culminando con el envío a faena de los animales 13 días después de la última medición. Los animales se alojaron en corrales individuales con una dimensión de 15 m<sup>2</sup> por animal, cada corral tenía bebedero y comedero individual.

La RTM se formuló para obtener una GMD de 1,4 kg / días, utilizando el software Taurus (versión 2014), UC Davis y el Beef Cattle Nutrient Requirements Model 2016 (versión 1.0.37.15). La RTM fue preparada diariamente entre 08:00 h y 10:00 h utilizando un Mixer (Mary, M8, Santa Catalina, Soriano – Uruguay) para mezclar los



ingredientes. Luego se pesó en una balanza (Marvic, Montevideo, Uruguay) la cantidad diaria asignada para cada novillo y se embolsó individualmente. La RTM fue distribuida dos veces por día (11:00 h y 16:00 h) en partes iguales.

Los aditivos se suministraron diariamente con la RTM (11:00 h), a cada novillo según el tratamiento de manera de asegurar el consumo total de la dosis diaria. La composición química y los insumos utilizados en la RTM se presentan en el Cuadro 2. Donde la proporción de cada ingrediente en MS de la RTM fue: grano de maíz (71,8%), heno de pastura (17%), harina de soja (10,1%) y un núcleo vitamínico-mineral (1,2%), aportando por Kg: vitamina A, 53000 UI; vitamina D, 10600 UI; vitamina E, 200 UI; Co, 2.6 mg; I, 18.4 mg; Se inorg., 4.4 mg; Zn inorg., 1200 mg / kg; Cu inorg., 421mg; Na, 6.3 g; Mg, 1.5g / kg; Ca, 22.0 g. A la mezcla se le añadió agua, siendo la misma un 27% del alimento fresco.

**Cuadro 2.** Composición química de la ración totalmente mezclada (RTM) e ingredientes utilizados. Valores expresados como % de la MS salvo que se indique otra cosa (DE entre paréntesis).

Item	RTM	GM	HS	Heno
<i>Composición de nutrientes</i>				
MS, % fresco	65,0 (1,4)	86,7 (0,4)	91,3 (0,2)	86,6 (1,0)
MO	96,4 (0,4)	98,6(0,01)	93,0(0,01)	92,4 (0,007)
FDN	23,0 (2,8)	8,0 (0,4)	10,7 (0,4)	59,4 (1,0)
FDA	11,0 (0,8)	2,4 (0,1)	7,8 (0,9)	37,9 (0,6)
PB	12,8 (1,5)	-	38,6 (3,2)	6,3 (0,1)

RTM (ración totalmente mezclada), GM (grano de maíz), HS (harina de soja), MO (materia orgánica), FND (fibra neutra detergente), FDA (fibra ácido detergente), PB (proteína bruta).

## 5.2 Toma de muestras y determinaciones

Los días 19, 33 y 47 se extrajo líquido ruminal a cada animal, en ocho horarios (a las 9:30; 13:00; 15:00; 17:00; 19:00; 21:00; 3:00 y 9:30 h) cada día. Una vez extraído el líquido ruminal, inmediatamente se midió el pH con un pH-metro digital previamente calibrado. Se tomó una sub muestra de 1ml de líquido ruminal, en tubo eppendorf conteniendo 0,02 ml de ácido sulfúrico (al 50 %) como conservante para posterior análisis de N-NH<sub>3</sub>. Para determinar la concentración de AGVs otra submuestra de 1ml de líquido ruminal se conservó en un tubo eppendorf conteniendo 1 ml de ácido perclórico (0.1 M).

Todas las muestras se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

La concentración de N-NH<sub>3</sub> se midió por colorimetría utilizando una reacción de fenol e hipoclorito según (Watherburn, 1976) y un espectrofotómetro (1200, UNICO®; United Products & Instruments Inc., Dayton, OH, EE. UU.). Para la determinación de AGVs las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron (10.000 g a 4 °C, durante 15 min) y se analizaron mediante HPLC (Dionex Ultimate 3000, Sunnyvale, CA), según lo descrito por (Adams, Jones, & Conway, 1984), utilizando una columna Acclaim Rezex Organic Acid H+ (8 %) de 7,8 x 300 mm, ajustada a 210 nm. La concentración total de AGVs se calculó como la suma de las concentraciones de ácido acético, propiónico y butírico.

### 5.3 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el software SAS versión 9.0 (SAS Institute Inc). Inicialmente en busca de valores atípicos y la normalidad de los residuos se verificó con procedimientos univariados (PROC UNIVARIATE). El procedimiento utilizado para los datos fue PROC MIXED con el siguiente modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + T_j + M_k + A_l + H_m + T_j \times H_m + e_{ijkl}$$

Siendo:  $Y_{ijkl}$  = la variable dependiente,  $\mu$  es la media general,  $B_i$  el efecto aleatorio del bloque ( $i = 1$  a  $3$ ),  $T_j$  el efecto fijo del tratamiento ( $j = \text{MON, AV o AV+MON}$ ),  $M_k$  el efecto aleatorio del momento de medición ( $k = 1$  a  $3$ ),  $A_l$  es el efecto aleatorio del animal ( $l = 1$  a  $30$ ),  $H_m$  el efecto fijo de la hora de medición ( $m = 1$  a  $8$ ),  $T_j \times H_m$  es el efecto fijo de la interacción entre el tratamiento x la hora de medición y  $e_{ijklm}$  es el error residual.

Para las variables con medidas repetidas en el tiempo la estructura de covarianza utilizada fue el poder espacial (SP (POW)).

Las medias se separaron con el test de Tukey, declarándose significancias con  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

En el Cuadro 3 se presentan los parámetros de fermentación ruminal obtenidos para cada tratamiento. No se observó efecto de los tratamientos sobre el pH ruminal, ni la concentración de N-NH<sub>3</sub>, para estas variables se detectó efecto de la hora de muestreo, pero no hubo interacción entre el tratamiento y la hora de medición.

**Cuadro 3.** Parámetros de fermentación ruminal de novillos consumiendo una RTM adicionada con AV, MON o ambos

Item	Tratamientos (Trat) <sup>1</sup>			EEM <sup>2</sup>	Valor de P		
	AV	MON	AV+MON		Trat	Hora	Trat x Hora
pH							
Promedio	6,00	5,80	5,90	0,061	0,180	<0,001	0,94
Máximo	7,02	6,81	6,66	0,137	0,196	-	-
Mínimo	5,32	5,11	5,22	0,094	0,179	-	-
Rango	1,69	1,65	1,42	0,170	0,469	-	-
AGV total, mM							
Acético, mM	127,3	123,4	119,4	8,81	0,750	0,002	0,032
Propiónico, mM	67,0	63,6	56,3	5,39	0,150	0,004	0,050
Butírico, mM	44,2	42,6	49,7	5,90	0,500	0,005	0,110
Butírico, mM	16,2ab	18,4a	14,4b	1,77	0,011	0,003	0,010
Acético, %							
Acético, %	53,7	50,1	47,4	3,51	0,372	<0,001	0,101
Propiónico, %	33,3y	34,9xy	42,1x	3,27	0,061	<0,001	0,843
Butírico, %	13,0ab	14,7a	11,5b	1,42	0,022	0,210	0,182
Acético / Propiónico	1,7	1,5	1,1	0,26	0,180	0,001	0,813
N-NH <sub>3</sub> , mg / dl							
Promedio	17,9	16,9	20,7	5,07	0,853	0,014	0,827
Máximo	29,1	29,2	32,9	7,34	0,916	-	-
Mínimo	8,5	5,6	6,1	2,20	0,614	-	-
Rango	20,9	23,8	27,1	5,86	0,754	-	-

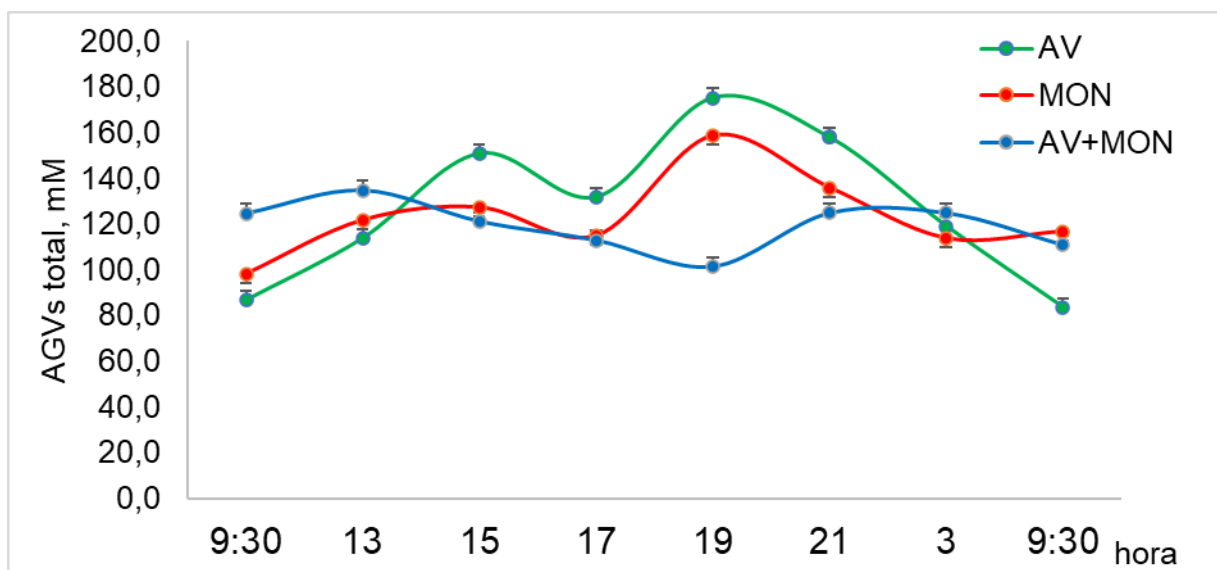
<sup>a,b</sup> En una misma fila, valores con diferente superíndice son diferentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>x,y</sup> En una misma fila, valores con diferente superíndice indican tendencia ( $0,05 < p < 0,1$ ).

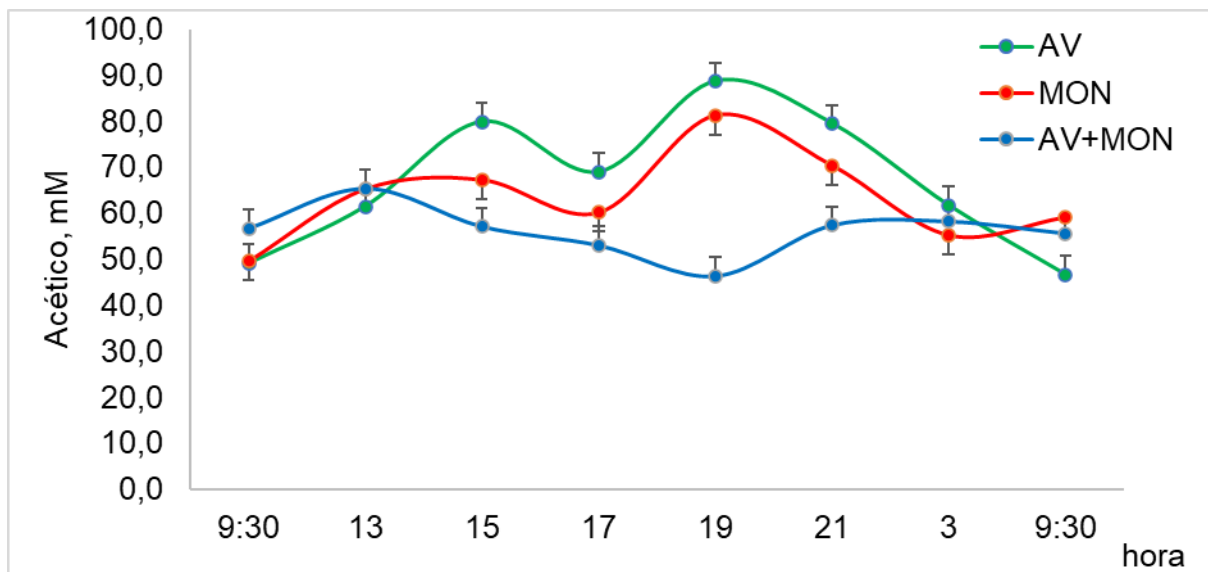
<sup>1</sup>Trat = Tratamientos.

<sup>2</sup>EEM = error estándar de la media

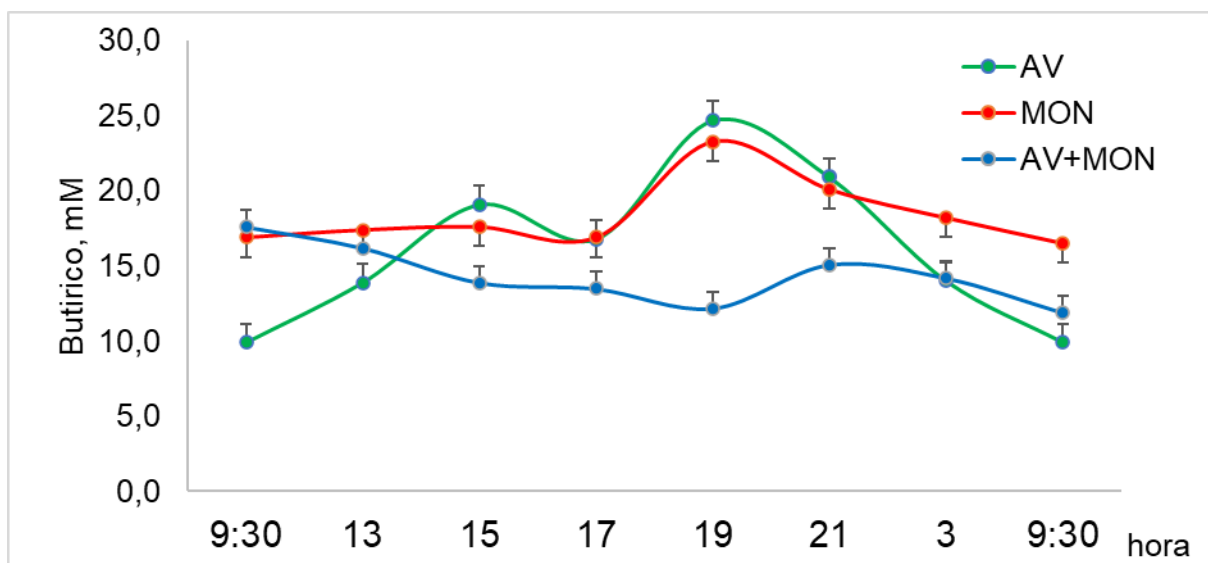
La concentración total de AGVs promedio no difirió entre los tratamientos, pero existió una interacción entre el tratamiento y la hora de medición. La evolución de la concentración total de AGVs se muestra en la Figura 2. La concentración mM y también la proporción molar de ácido butírico fue mayor en el tratamiento MON respecto a AV+MON, presentando AV valores intermedios que no difirieron de los otros dos tratamientos. Existió una interacción entre el tratamiento y la hora de muestreo para la concentración de ácido acético y ácido butírico. A diferencia de los otros dos tratamientos en AV+MON la concentración de AGVs totales, de ácido acético y butírico no se incrementó entre las 17:00 h y 21:00 h. La evolución de la concentración de ácido acético y butírico para cada tratamiento se presenta en las Figuras 3 y 4 respectivamente. La proporción molar de ácido propiónico tendió a ser mayor en AV+MON respecto a AV, aunque la relación acético / propiónico no difirió entre los tres tratamientos.



**Figura 2.** Evolución de la concentración total de AGVs de novillos alimentados con una dieta de terminación adicionada con AV, MON o ambos.



**Figura 3.** Evolución de la concentración de ácido acético de novillos alimentados con una dieta de terminación adicionada con AV, MON o ambos.



**Figura 4.** Evolución de la concentración de ácido butírico de novillos alimentados con una dieta de terminación adicionada con AV, MON o ambos.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Efecto individual con cada aditivo

La fermentación ruminal fue similar al adicionar AV o MON en forma individual a la RTM, no observándose diferencia en ninguna de las variables estudiadas. Los valores promedios de pH ruminal estuvieron acorde a los predichos por los programas (NRC, CNCPS, TAURUS) para la RTM suministrada, y concuerdan con lo esperado para novillos en terminación consumiendo dietas con 20 % de forraje en MS (variando entre el 6 % y el 38 %) y 2,1 Mcal de EM / kg MS, en sistemas comerciales. La ausencia de efecto de los tratamientos sobre el pH ruminal en nuestro trabajo, concuerda con lo reportado por (Geraci et al., 2012) en novillos comparando una mezcla de AE conteniendo cinamaldehído, eugenol y oleoresina, contra MON, sin encontrar diferencias entre ambos aditivos en el pH ruminal. En el mismo sentido (Elcoso, Zweifel, y Bach., 2019) utilizando AV en vacas lecheras y (Minozzo da Silveira et al., 2016) utilizando MON en estudios in vitro, no observaron diferencias en el pH respecto a un tratamiento control.

La concentración total de AGVs, así como la proporción individual de cada uno obtenidos en nuestro experimento concuerdan con lo reportado por (Calsamiglia., et al 2023). Estos autores analizando 17 experimentos in vivo donde se utilizaron 29 AE a dosis entre 0,04 y 10 g / vaca / d (media 1,39 g / vaca / d), encontraron una concentración total de AGVs de 125,6 mmol, con un 64,3 % de ácido acético, 22,3 % de ácido propiónico y 14,6 % de ácido butírico, en promedio para el conjunto de los tratamientos analizados. En el mismo sentido que los resultados de nuestro experimento, comparando con una dieta RTM sin aditivos y una RTM más MON en el experimento de (Minozzo Da Silveira et al., 2016) o de AV en el reporte de (Grossi et al., 2021), observaron un aumento del ácido propiónico y disminución de los ácidos acético y butírico para ambos aditivos por separado.

Comparando la concentración total de AGVs al adicionar MON o una mezcla de AE (conteniendo timol, eugenol, vanillina, guayacol y limoneno) a una RTM para novillos en terminación similar a los de nuestro experimento, (Meyer et al., 2009) encontraron mayor concentración con la adición de AE. Sin embargo, estos mismos autores, en el mismo experimento, pero utilizando otra mezcla de AE que contenía guayacol, linalol y  $\alpha$ -pineno, no observaron diferencias en la concentración total de AGVs respecto a la adición de MON, adjudicando al timol un papel central en la explicación de la diferencia (Meyer et al., 2009). Esta variabilidad del efecto de los aditivos fitogénicos sobre la fermentación ruminal involucra múltiples factores como el tipo de principio activo, la dosis utilizada y el tiempo de suministro. Reafirmando la gran variabilidad del efecto sobre la producción de AGV de los AE, de 84 reportes in vitro probando diferentes AE revisados por (Hart, Yáñez-Ruiz, Duval, McEwan & Newbold, 2008), la concentración total de AGVs se redujo en el 22 % de los ensayos y sólo en el 5 % observaron un aumento de la concentración de ácido propiónico.

Los perfiles de AGVs similares entre MON y AV coinciden con lo reportado cuando se los comparó por separado contra un control sin aditivo, in vivo por (Grossi et al.,

2021) para AV e in vitro por (Sgoifo, 2020), (Viegas, comunicación personal) para AV y MON, observándose un aumento en el ácido propiónico y una disminución en el ácido acético. Sin embargo, otros trabajos no encontraron modificaciones del perfil de AGVs al comparar la adición de AV frente a un control sin aditivos in vivo (Elcoso, et al, 2019).

Con respecto a los valores de N-NH<sub>3</sub>, la similar concentración entre MON y AV podría atribuirse a que la MON inhibe la proteólisis y la desaminación (Bergen & Bates., 1984), mientras que los TN y AE presentes en AV reducen la producción de N-NH<sub>3</sub> y CH<sub>4</sub> en el rumen (Sgoifo y Copiani, 2021). Sin embargo, estos resultados no coinciden con los informados para novillos en engorde a corral por (Geraci et al., 2012), quienes observaron una reducción de la concentración de N-NH<sub>3</sub> utilizando una combinación de cinamaldehído, eugenol y oleoresina, comparando con MON. Podría atribuirse a la diferencia entre las dietas, en el experimento mencionado se utilizó urea como fuente de proteína, siendo mayor el aporte de nitrógeno directo y harina de girasol, la cual es más fermentable.

## **7.2 Efecto de ambos aditivos combinados**

Los principales principios activos con actividad antimicrobiana de AV son eugenol, linalol, geraniol y limoneno presentes en los AE, clasificados químicamente como fenilpropanoides y terpenos con mecanismos de acción diferentes a los de la MON. Adicionalmente AV podría reforzar la reducción de la concentración de N-NH<sub>3</sub> causada por la MON, debido a la acción directa de los TN sobre las proteínas. En el Cuadro 1 se detallan los componentes de AV.

Efectivamente la adición simultánea de AV y MON modificó la cinética de fermentación en el rumen, reflejada en la menor concentración de ácido butírico entre las 15:00 h y 21:00 h comparado a los otros tratamientos y redujo la concentración promedio respecto MON (Figura 4 y Cuadro 3). Esta reducción de la concentración de ácido butírico explica al menos en parte, la interacción entre el tratamiento y la hora de medición observada para la concentración total de AGVs y de ácido acético. Para estas dos últimas variables, el tratamiento AV+MON tuvo valores más bajos a las 19:00 h respecto los tratamientos (Figuras 2 y 3), aunque no detectamos diferencias en la concentración promedio diaria (Cuadro 3).

La menor concentración de ácido butírico en AV+MON respecto a MON podría estar relacionado a que el mecanismo por el cual la MON disminuye la producción de ácido butírico es fundamentalmente reduciendo la población de *Butirivivrio Fibrosolven* (Chen & Wolin, 1979). Sin embargo, AV disminuye además la población de *Prevotella* (spp) que es el principal género de la microbiota planctónica generadora de ácido butírico cuando se suministran dietas con alto contenido de concentrado (Ricci et al., 2022). En este sentido, comparando la adición de 400 mg / kg de TMR (base de materia seca) de un aditivo fitogénico conteniendo mentol, timol y eugenol contra un tratamiento control sin aditivos, (Rivera Chacon et al., 2022) informaron un aumento de la proporción de ácido butírico de 12,0 a 14,0 % con el

aditivo fitogénico. Por otro lado, la mayoría del butirato formado en la fermentación ruminal es utilizado por el epitelio del rumen (Tamate, McGilliard, Jacobson & Getty, 1962), y la permeabilidad del epitelio del rumen varía según el nivel de pH y la concentración de butirato, que pueden haber afectado la concentración hallada en cada tratamiento (Fleming et al., 2020).

No difirieron las concentraciones promedio, pero si existió interacción entre la hora de muestreo y el tratamiento para la concentración total de AGVs y de ácido butírico. Reflejando lo informado por (Calsamiglia, Rodríguez-Prado, Fernández-Turren & Castillejos, 2023) respecto a que, en estudios in vivo donde las muestras ruminales se toman a lo largo del día, las diferencias que pueden ser significativas unas pocas horas después de la alimentación pueden diluirse con el flujo de digesta a lo largo del día, lo que hace que la diferencia sea a menudo difícil de detectar.

La tendencia a aumentar la proporción de ácido propiónico en AV+MON con respecto a AV, podría deberse al mayor efecto cuando se suministraron en simultáneo dado sus distintos modos de acción (Geraci, Garciarena, Gagliostro, Beauchemin & Colombatto, 2012).

En nuestro experimento los cambios en el perfil de AGVs se produjeron sin modificación de la concentración promedio total de AGVs, siendo que en muchos casos se ha reportado que el cambio del perfil de AGVs ocurre a dosis superiores a las que reducen la producción total de AGV, lo cual es contraproducente para el desempeño productivo (Cardozo, Calsamiglia, Ferret, & Kamel, 2006).

Por otro lado la falta de efecto de los tratamientos sobre la concentración de N-NH<sub>3</sub>, aunque no condice con lo reportado por (Calsamiglia et al., 2023) quien analizando 8 experimentos in vitro encontró una reducción de la concentración de N-NH<sub>3</sub> en promedio de -28 % (15,9 a 11,5 mg N-NH<sub>3</sub> / dl). Así como tampoco con lo reportado in vitro para unas 28 combinaciones de TN y mezcla de AE por (Foggi et al., 2022). Debe considerarse que los resultados obtenidos in vivo respecto a los ensayos in vitro generalmente la dosis (en mg / l) es consistentemente más baja, por efecto de la tasa de pasaje a través del rumen y además debido a ello la probabilidad de interactuar con el sitio activo (membrana celular microbiana) es mucho menor (Calsamiglia et al., 2007). Este no es un problema específico de los AE, diferencias similares en las dosis entre in vitro e in vivo ocurre con la MON.

## 8. CONCLUSIÓN

Adicionar simultáneamente Anavrin® y Monensina disminuye la concentración de ácido butírico, alterando la evolución de la concentración total de AGVs, comparado a adicionar cada uno por separado. Utilizando como único aditivo Anavrin® o Monensina no se encontraron diferencias en los parámetros de fermentación ruminal, en las condiciones de esta tesis.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. F., Jones, R. L., & Conway, P. L. (1984). High-performance liquid chromatography of microbial acid metabolites. *Journal of Chromatography*, 336(1), 125-137. [https://doi.org/10.1016/s0378-4347\(00\)85136-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4347(00)85136-1)
- Bergen, W. G., & Bates, D. B. (1984). Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *Journal of Animal Science*, 58(6), 1465-1483.
- Bervejillo, J. (2021). Comportamiento del sector de la carne vacuna. En Oficina de Programación y Política Agropecuaria, *Anuario de Opypa 2021*, (pp.31-51). Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/analisis-sectorial-cadenas-productivas/comportamiento>
- Bodas, R., López, S., Fernández Gutiérrez, M., García-González, R., Wallace, R. J., & González, J. S. (2007). Selección de aditivos fitogénicos para reducir la metanogénesis ruminal. *ITEA*, 28(I), 240-242.
- Broudiscou, L. P., Papon, Y., & Broudiscou, A. F. (1999). Optimal mineral composition of artificial saliva for fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 79(1-2), 43-55.
- Broudiscou, L. P., & Lassalas, B. (2000). Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*, 40(5), 431-440.
- Caja, G., García, E. G., Flores, C., Carro, M. D., & Albanell, E. (2003). Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. En *Curso de Especialización FEDNA "Avances en nutrición y alimentación animal"* (Vol. XIX, pp. 183-212). Madrid: FEDNA. Recuperado de <https://hal.science/hal-01600239/document>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595.
- Calsamiglia, S., Rodríguez-Prado, M., Fernández-Turren, G., & Castillejos, L. (2023). The use of plant extracts as dietary supplements in dairy cow nutrition: plant essential oils. En A. N. Hristov, *Advances in sustainable dairy cattle nutrition* (pp. 115-148). Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers

- fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 84(10), 2801-2808.
- Carrasco, A. V., Peterson, C. B., Zhao, Y., Pan, Y., McGlone, J. J., DePeters, E. J., & Mitloehner, F. M. (2020). The impact of essential oil feed supplementation on enteric gas emissions and production parameters from dairy cattle. *Sustainability*, 12(24), 10347. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3390/su122410347>
- Carro, M.D. & Ranilla, M.J. (2002). Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales. Situación actual y posibles alternativas. *Información Veterinaria*, 238, 35-45.
- Cedrés, F., & Cunha, A. (2013). *La utilización de sistemas de engorde a corral por la industria frigorífica uruguaya. Una aproximación de su impacto en el mercado* (Tesis de grado). Facultad de Ciencias Económicas y Administración Udelar, Montevideo. Recuperado de <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/688/1/M-CD4535.pdf>
- 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(1), 72-77.
- Comisión Europea. (2012, junio 11). Reglamento de Ejecución (UE) N° 481/2012 de la Comisión de 7 de junio de 2012, por el que se establecen las normas de gestión de un contingente arancelario de carne de vacuno de calidad superior. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX%3A32012R0481>.
- Doyle, M.P & Erickson, M.C. (2006). Reducir el transporte de patógenos transmitidos por los alimentos en el ganado y las aves de corral. *Ciencia Avícola*, 85 (6), 960-973
- Elcoso, G., Zweifel, B., & Bach, A. (2019). Effects of a blend of essential oils on milk yield and feed efficiency of lactating dairy cows. *Applied Animal Science*, 35(3), 304-311.
- Fleming, A., Garrett, K., Froehlich, K., Beck, M., Bryant, R. H., Edwards, G., & Gregorini, P. (2020). Supplementation of spring pasture with harvested fodder beet bulb alters rumen fermentation and increases risk of subacute ruminal acidosis during early lactation. *Animals*, 10(8), 1307.
- Foggi, G., Terranova, M., Conte, G., Mantino, A., Amelchanka, S. L., Kreuzer, M., & Mele, M. (2022). In vitro screening of the ruminal methane and ammonia mitigating potential of mixtures of either chestnut or quebracho tannins with blends of essential oils as feed additives. *Italian Journal of Animal Science*, 21(1), 1520-1532.
- Fraga-Corral, M., García-Oliveira, P., Pereira, A. G., Lourenço-Lopes, C., Jimenez-Lopez, C., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020).

- Technological Application of Tannin-Based Extracts. *Molecules*, 25(3), 614. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3390/molecules25030614>
- Freer, M., Dove, H., & Nolan, J. V. (Eds). (2007). Application. En *Nutrient requirements of domesticated ruminants* (pp. 227-233). Collingwood: CSIRO Publishing.
- Gatica Eguiguren, M., & Rojas, H. (2018). Gestión sanitaria y resistencia a los antimicrobianos en animales de producción. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 118-125. Recuperado de: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3571>
- Geraci, J. I., Garcarena, A. D., Gagliostro, G. A., Beauchemin, K. A., & Colombatto, D. (2012). Plant extracts containing cinnamaldehyde, eugenol and capsicum oleoresin added to feedlot cattle diets: Ruminal environment, short term intake pattern and animal performance. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 123-130.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 279-290.
- Grossi, S., Trevisan, M., Compiani, R., & Sgoifo Rossi, C.A. (2021). Meno metana ayudando il lavoro del rumine. *Informatore Zootecnico*, 9,44-49
- Haney, M., & Hoehn, M. (1967). Monensin, un nuevo biológicamente activo compuesto I: Descubrimiento y aislamiento. *Antimicrobiano Agentes Quimioterapia*, 349,3497
- Haslam, E. (1994). Complexation and oxidative transformation of polyphenols. Polyphenols, 94, Palma de Mallorca (España), May 23-27. Ed. INRA, Paris 1995 (Les Colloques, no 69).
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55(6), 481-504.
- Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 8-35. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09>
- Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T., & Wang, Y. (2018). Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4(2), 137-150.
- Jones, W. T., & Mangan, J. L. (1977). Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 28(2), 126-136.
- Kaçar D (2008): *Detección de algunas especies de plantas por sus actividades antioxidantes y antimicrobianas totales*. Tesis de maestría.

Escuela de Graduados de Ingeniería y Ciencias del Instituto de Tecnología de izmir, izmir.

- Kariuki, I. W., & Norton, B. W. (2008). The digestion of dietary protein bound by condensed tannins in the gastro-intestinal tract of sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 142(3-4), 197-209.
- Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(3), 241-256.
- McLeod, M.N. (1974). Plant tannins - Their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*, 44, 803-812.
- Meyer, N. F., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J., Greenquist, M. A., Luebke, M. K., Williams, P., & Engstrom, M. A. (2009). Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. *Journal of Animal Science*, 87(7), 2346-2354.
- Michalak, M., Wojnarowski, K., Cholewińska, P., Szeligowska, N., Bawej, M., & Pacoń, J. (2021). Selected alternative feed additives used to manipulate the rumen microbiome. *Animals*, 11(6), 1542. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.3390/ani11061542>
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673-751.
- Min, B. R., Attwood, G. T., McNabb, W. C., Molan, A. L., & Barry, T. N. (2005). The effect of condensed tannins from *Lotus corniculatus* on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 121(1-2), 45-58.
- Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., & McNabb, W. C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106(1-4), 3-19.
- Minozzo da Silveira, A., Viégas, J., Bayer, C., Vilmar Kozloski, G., Giacomazza Cerrutti, W., Moro, G., ... Prado de Vargas, D. (2016). Effect of organic acids or monensin-sodium addition on fatty acid production of short chain and methane through the ruminal fermentation "in vitro". *Semina. Ciências Agrárias*, 37(1), 439-448.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological research*, 152(3), 239-246.
- Nehme, R., Andrés, S., Pereira, R. B., Ben Jemaa, M., Bouhallab, S., Cecilian, F., ... Abdennebi-Najar, L. (2021). Essential oils in livestock: From health to food quality. *Antioxidants*, 10(2), 330.

- Odongo, N. E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M. M., Hook, S. E., ... McBride, B. W. (2007). Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1781-1788.
- Pozo, C.A., Kozloski, G.V., Cuffia, M., Repetto, J. L., & Cajarville, C. (2022). Changing the grazing session from morning to afternoon or including tannins in the diet was effective in decreasing the urinary nitrogen of dairy cows fed a total mixed ration and herbage. *Journal of Dairy Science*, 105, 4987-5003.
- Ravidran, V. (2011). Aditivos en la alimentación animal: presente y futuro(I). *Producción Animal*, 26(264),37-51.
- Ricci, S., Pacífico, C., Castillo-Lopez, E., Rivera-Chacon, R., Schwartz-Zimmermann, H. E., Reisinger, N., ... & Petri, R. M. (2022). Progressive microbial adaptation of the bovine rumen and hindgut in response to a step-wise increase in dietary starch and the influence of phytogenic supplementation. *Frontiers in Microbiology*, 13, 920427.
- Rivera-Chacon, R., Castillo-Lopez, E., Ricci, S., Petri, R. M., Reisinger, N., & Zebeli, Q. (2022). Supplementing a phytogenic feed additive modulates the risk of subacute rumen acidosis, rumen fermentation and systemic inflammation in cattle fed acidogenic diets. *Animals*, 12(9), 1201. Recuperado de <https://doi.org/10.3390/ani12091201>
- Rossi, C. A. S., Grossi, S., Dell'Anno, M., Compiani, R., & Rossi, L. (2022). Effect of a blend of essential oils, bioflavonoids and tannins on *in vitro* methane production and *in vivo* production efficiency in dairy cows. *Animals*, 12(6). Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3390/ani12060728>
- Rodríguez, J. M. P., & Muñoz, S. S. G. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25(8), 379-385
- Russell, J. B. (1987). A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminant bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. *Journal of Animal Science*, 64(5), 1519-1525.
- Russell, J. B., & Strobel, H. J. (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(1), 1-6. Recuperado de <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.1-6.1989>
- Schelling, G. T. (1984). Monensin mode of action in the rumen. *Journal of Animal Science*, 58(6), 1518-1527.
- Seré, C., & Steinfeld, H. (1996). *World livestock production systems. Current status, issues and trends*. Rome: FAO.
- Sgoifo Rossi, C.A. (2020). *Effect of Green Plus (Vetos Europe SAGL) on in vitro methane production in a 16- and 24-hours Biochemical Methane Potential assay (Informe)*. Milan: Università Degli Studi di Milano.

- Sofos, J. N. (2008). Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science*, 78(1-2), 3-13.
- Tamate, H., McGilliard, A. D., Jacobson, N. L., & Getty, R. (1962). Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science*, 45(3), 408-420.
- Uruguay. (2010, junio 17). Decreto N° 178/010: Sanidad animal. establecimientos de engorde de bovinos a corral con destino a faena. Recuperado de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/178-2010>
- Viégas, J.(s.f.). *Determination of the kinetics of ruminal in vitro fermentation and production of methane and volatile fattyacids of diets containing natural additives* (Reporte). Santa María: Federal University of Santa Maria. Recuperado de <https://vetoseurope.ch/wpcontent/uploads/2022/02/DETERMINATION-OF-THE-KINETICS-OF-RUMINAL-IN.VITRO .pdf>
- Wang, Y., Waghorn, G. C., Barry, T. N., & Shelton, I. D. (1994). The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on plasma metabolism of methionine, cystine and inorganic sulphate by sheep. *British Journal of Nutrition*, 72(6), 923-935.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(3), 218-223.
- Yaghoubi, M. J., Gh, G., & Satari, R. (2007). Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 45-48.