



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE DIETAS ENERGÉTICAS PARA OVINOS
CON INCLUSIÓN DE SEMILLA DE GIRASOL**

JERÓNIMO HERRERA PÉREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2013

La presente tesis titulada: **Digestibilidad *in vitro* de dietas energéticas para ovinos con inclusión de semilla de girasol** realizada por el alumno: Jerónimo Herrera Pérez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

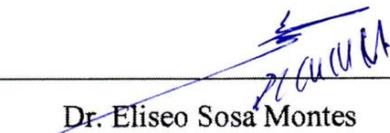
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



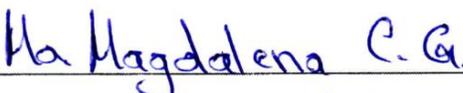
Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR



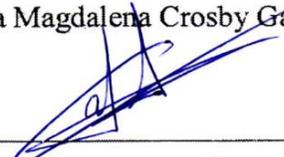
Dr. Eliseo Sosa Montes

ASESORA



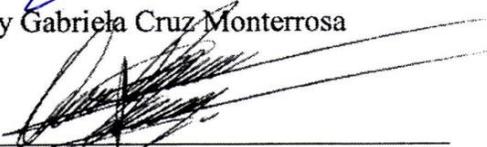
Dra. María Magdalena Crosby Galván

ASESORA



Dra. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa

ASESOR



Dr. Oscar Enrique del Razo Rodríguez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, mayo 2013

DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE DIETAS ENERGÉTICAS PARA OVINOS CON INCLUSIÓN DE SEMILLA DE GIRASOL

Herrera Pérez Jerónimo M. C.

Resumen general

Cinco dietas integrales isoenergéticas e isoprotéicas fueron evaluadas con el objetivo de medir la producción de gas *in vitro* y asociarla con la digestibilidad de la materia seca en dietas para corderos elaboradas con 0, 3, 6, 9 y 12 % de inclusión de semilla de girasol. Se midió la producción de gas *in vitro* (PGSIV) (volumen máximo de gas (V_{max} ; mL g⁻¹) para materia seca (MS), materia orgánica (MO) y materia seca degradada (MSD), la digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS), y producción de ácidos grasos volátiles (AGV) a las 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. El diseño experimental fue completamente al azar con bloques generalizados utilizando el procedimiento MIXED del SAS. Se realizaron polinomios ortogonales para probar el efecto lineal y cuadrático por el incremento gradual de semilla de girasol. La comparación de medias se efectuó con la prueba de Tukey. Los valores de DIVMS a las 6, 12, 24 y 48 h no cambiaron ($P>0.05$) por la inclusión de semilla de girasol en la dieta. Sin embargo, a las 72 h de incubación se presentó una disminución lineal ($P=0.03$) en la DIVMS. El incremento gradual de semilla de girasol no afectó ($P>0.05$) la producción de gas *in vitro* por gramo de MS, MO y MSD incubada. Respecto a la producción de ácidos grasos volátiles *in vitro*, de acuerdo con la MSD, se observó que el ácido acético disminuyó linealmente ($P<0.05$) por el incremento gradual de semilla de girasol. Además, con la inclusión de 12 % de semilla de girasol, se presentó una disminución cuadrática ($P<0.05$) en la producción de ácido acético. El ácido propiónico disminuyó linealmente ($P=0.09$) por el incremento gradual de semilla de girasol. La producción total de ácidos grasos volátiles también disminuyó linealmente ($P=0.09$) y la proporción acético propiónico mostró una disminución cuadrática ($P<0.05$) al incluir 12 % de semilla de girasol. La semilla de girasol no incrementa la digestibilidad de la materia seca ni la producción de gas *in vitro* de una dieta con 80 % de concentrado en las concentraciones evaluadas.

Palabras clave: ácidos grasos volátiles, producción de gas, oleaginosas.

***In vitro* DIGESTIBILITY of ENERGY DIETS FOR SHEEP INCLUDING SUNFLOWER SEEDS**

Herrera Pérez Jerónimo M. C.

General abstract

Five isoenergetic and isoproteic complete diets were evaluated in order to measure on *in vitro* gas production and associate with dry matter digestibility in diets for lambs prepared with 0, 3, 6, 9 and 12 % inclusion of seed sunflower. Was measured *in vitro* gas production (IVPGS) (maximum volume of gas (V_{max} ; mL g⁻¹) for dry matter (DM), organic matter (OM) and dry matter degraded (DDM), *in vitro* digestibility of DM (IVDMD), and production of volatile fatty acids (VFA) at 6, 12, 24, 48 and 72 h of incubation. The experimental design was completely randomized with generalized blocks using the MIXED procedure of SAS. Orthogonal polynomials were performed to test the linear and quadratic effects of the gradual increase of sunflower seed. Comparison of means was performed with the Tukey test. IVDMD values at 6, 12, 24 and 48 h did not change ($P>0.05$) by the inclusion of sunflower seed in the diet. Nevertheless on 72 h of incubation showed a linear decrease ($P=0.03$) in IVDMD. The gradual increase of sunflower seed did not affect ($P>0.05$) *in vitro* production of gas per gram of DM, OM and incubated DMS. Respect to *in vitro* production of volatile fatty acids, in accordance with the DMSD, was observed that the acetic acid linearly decreased ($P<0.05$) by the gradual increase of sunflower seed. Furthermore, with the inclusion of 12 % of sunflower seed, showed a quadratic decrease ($P<0.05$) in acetic acid production. The propionic acid linearly decreased ($P=0.09$) for the gradual increase of sunflower seed. The total production of volatile fatty acids also linearly decreased ($P=0.09$) and acetic propionic ratio showed a decrease quadratic ($P<0.05$) to include 12 % of sunflower seed. The sunflower seed does not increases *in vitro* digestibility of the dry matter or gas production of a diet with 80 % concentrate at the evaluated concentrations.

Keywords: volatile fatty acids, gas production, oilseeds.

Agradecimientos

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

Al Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca por su paciencia, confianza, amistad, asesoría y disponibilidad para conducir mi formación académica en el Colegio de Posgraduados.

Al Dr. Eliseo Sosa Montes por su apoyo en este proyecto de investigación y por su disponibilidad, confianza y amistad para concluir el posgrado.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galván por su asesoría, disponibilidad y amistad durante mi estancia en el CP.

A la Dra. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa, por su apoyo incondicional, paciencia y amistad durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Oscar Enrique del Razo Rodríguez, por ser parte de mi consejo particular.

Al personal técnico del laboratorio de Nutrición animal del Colegio de Postgraduados: Sr. Anastasio Galicia Juárez, Sr. Jorge Osvaldo López Anides, Sr. José Luis de la Rosa y Sr. Agustín Hernández, por su apoyo, colaboración y amistad durante el programa de Maestría.

A mis compañeros y amigos, en especial a Nicolás Torres Salado, Marco Antonio Ayala Monter y Juan Carlos Torres Ramírez del programa de Ganadería, así como a Efraín Espinosa Méndez del Programa de Desarrollo Rural del Colegio de Posgraduados, por su apoyo y amistad durante la realización del postgrado.

Dedicatoria

En primer lugar, a Dios, por permitirme ver nuevos amaneceres día con día, y por darme una segunda oportunidad de vida.

A mi padres Fortunata y Jerónimo, por su amor y dedicación para que su servidor llegara a ser un profesionista.

A mis hermanos Ma. Del Refugio, Obdulia, Andrés, Luis y Víctor, por su cariño, comprensión y respeto.

A mis sobrinas y sobrinos a quienes sin distinción les comento que esto es una muestra de algo que se puede hacer en la vida y que espero con gran ilusión que la mayoría de ustedes lleguen a graduarse de una carrera universitaria.

A mis dos amores, mis queridos y amados hijos Jerónimo y Nancy, por ser el motor más importante que me impulso para concluir el postgrado; por ustedes.

Esta tesis fue financiada con recursos de la línea de investigación LPI-11 "Sistemas de producción agrícola, pecuaria, forestal y acuícola" del Colegio de Posgraduados.

Contenido

	Paginas
Resumen general.....	iii
Agradecimientos	v
Dedicatoria.....	vi
Contenido de Cuadros.....	x
Contenido de Figuras	xi
1. Introducción	1
2.1. Uso de semillas como fuente de ácidos grasos en la alimentación de rumiantes.....	2
2.3. Técnicas de digestibilidad in vitro sus ventajas y desventajas.....	9
2.4. Producción de gas.....	9
2.5. Desarrollo de la técnica de producción de gas	11
2.5.1. Ventajas de la técnica de producción de gas in vitro	12
2.5.2. Factores que afectan la producción de gas	13
2.5.3 Desventajas de la técnica de producción de gas in vitro	13
2.6. Degradación de materia seca.....	14
2.7. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).....	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivo general.....	17
5.1. Objetivos específicos.....	17
6. Materiales y métodos	18
6.1. Localización	18
6.2. Animales y dieta.....	18
6.3 Preparación de las dietas experimentales con inclusión de semilla de girasol.....	18
6.4. Recolección del líquido ruminal	20

6.5. Preparación de reactivos.....	21
6.6. Preparación del inóculo.....	22
6.7. Preparación de los viales	22
6.8. Medición del gas	22
6.9. Métodos analíticos.....	23
6.9.1. Obtención de la materia seca.....	23
6.9.2. Preparación de muestras para AGV.....	23
6.10. Diseño experimental.....	24
7. Resultados y Discusión.....	25
7.1 Digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS)	25
7.2 Producción de gas in vitro por gramo de MS incubada	28
7.3 Producción de gas in vitro por gramo de materia orgánica incubada	30
7.4 Producción de gas in vitro por gramo de materia seca degradada	31
7.5 Producción ácidos grasos volátiles.....	32
8. Conclusiones	34
9. Literatura Citada	35
10. Anexos	44

Contenido de Cuadros

	Páginas
Cuadro 1 Composición de las dietas	19
Cuadro 2 Composición nutrimental de las dietas	20
Cuadro 3 Digestibilidad (%) in vitro de la materia seca de una dieta elaborada con semilla de girasol	27
Cuadro 4 Producción de gas in vitro (mL) por gramo de materia seca de una dieta elaborada con semilla de girasol	29
Cuadro 5 Producción de gas in vitro (mL) por gramo de materia orgánica de una dieta elaborada con semilla de girasol	30
Cuadro 6 Producción de gas in vitro (mL) por gramo de materia seca degradada de una dieta elaborada con semilla de girasol	32
Cuadro 7 Producción ácidos grasos volátiles in vitro de acuerdo con la materia seca degradada de una dieta elaborada con semilla de girasol	33

Contenido de Figuras

Páginas

Figura 1 Porcentaje de producción mundial de semilla de girasol	6
---	---

1. Introducción

Las semillas de oleaginosas, representan una excelente fuente de nutrientes concentrados, como es proteína y ácidos grasos poliinsaturados (Bertand Matthäus *et al.*, 2003). Además, las semillas de oleaginosas mejoran la ganancia diaria de peso, en comparación con suplementos de nitrógeno no proteico (Dixon *et al.*, 2003). Dado que dichas semillas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Gibb *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006), han sido evaluadas en algunos trabajos en dietas al destete de corderos y se ha observado un aumento en la concentración de ácidos grasos de cadena larga en músculo y grasa en corderos engordados de manera intensiva, mejorándose además el color de la grasa subcutánea (Berthelot *et al.*, 2012). Por su parte, (Rizzi *et al.*, 2002; Gibb *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2010) mencionan que es posible tener productos cárnicos de mejor calidad en cuanto a la composición de ácidos grasos benéficos a través de la suplementación con semillas oleaginosas, lo que proporcionaría opciones más saludables para el consumo humano de estos productos cárnicos. La inclusión de grasas saturadas de origen animal en la dieta humana puede aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Joyce *et al.*, 2009).

La técnica de producción de gas se diferencia de otras técnicas *in vitro* e *in situ*, no sólo por que determina la extensión, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado directamente como un producto de la fermentación, principalmente cuando se produce mayor proporción molar de acetato y butirato, e indirectamente desde la neutralización del fluido ruminal (Posada, 2005). La técnica de producción de gas *in vitro* permite determinar la modificación en la paja por los tratamientos químicos y biológicos, así como los efectos de compuestos secundarios en la actividad microbiana ruminal, describir la cinética de fermentación, analizar efectos asociativos de diversos alimentos, examinar el efecto de aditivos en la fermentación ruminal e identificar la composición de gases de la fermentación (Getachew *et al.*, 2005; Posada y Noguera, 2005). Debido a esto, se tomó la determinación de llevar a cabo este estudio con el objetivo de determinar la producción de gas *in vitro* y su asociación con la desaparición de la materia seca en dietas integrales para corderos, elaboradas con diferentes porcentajes de semilla de girasol, ya que existe poca información en nuestro país de estudios previos en los que se haya utilizado la semilla de girasol, como una fuente de proteína y de ácidos grasos poliinsaturados.

2. Marco teórico

2.1. Uso de semillas como fuente de ácidos grasos en la alimentación de rumiantes

En la actualidad, el uso de semillas oleaginosas está muy difundido en la búsqueda de nuevas alternativas, tanto para la industria como para la alimentación de animales domésticos, ya que para estos últimos proporcionan una excelente fuente de proteína concentrada, además de que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Bertand Matthäus *et al.*, 2003). Dixon *et al.*, (2003) mencionan que el uso de harinas de semillas oleaginosas como la linaza y el girasol, mejoran la respuesta en la ganancia diaria de peso en comparación con los suplementos que proporcionan nitrógeno no proteínico. Otra ventaja es la reducción al riesgo de problemas de acidosis y toxicidad por urea, lo cual justifica de manera importante el costo de los concentrados de proteína. Por otra parte, Dayani *et al.*, (2011) utilizaron corderos en engorda alimentados con semillas de algodón y determinaron que la inclusión de 20 % de esta semilla en la dieta disminuía la ganancia diaria de peso y la conversión alimenticia, y no tenía ningún efecto sobre la composición ni el rendimiento de la canal, lo que indica que la semilla de algodón para borregos en engorda no debe ser suplementada más allá del 20 % del total de la materia seca en la dieta.

Dentro de las semillas oleaginosas utilizadas en la alimentación animal, está la semilla de lino o linaza, la cual ha sido utilizada en la alimentación de vacas lecheras, obteniendo como resultados una reducción en la producción de ácidos grasos de cadena corta (C4 – C14) y de C16, sin embargo, la producción de C18 aumentó proporcionalmente en leche conforme se fue incluyendo la semilla de lino en la dieta (Grummer, 1991). Las semillas oleaginosas incluidas en la dieta de vacas productoras de leche puede cambiar la composición de los ácidos grasos de la leche, es decir, cambiar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados por ácidos grasos poliinsaturados (Liu, 2007).

Berthelot *et al.* (2012) utilizaron hojuela de semilla de linaza en dietas al destete de corderos y observaron un aumento en la concentración de ácidos grasos de cadena larga en músculo y grasa. Además, se mejoró el color de la grasa subcutánea. Similarmente, Peng *et al.* (2010) estudiaron el uso de semillas de oleaginosas y sugieren que la concentración de ácidos grasos saturados podría reducir en grasa intramuscular suministrando harina de semillas oleaginosas como el

cártamo. Así mismo, encontraron que la grasa de la cola de ovejas alimentadas con dietas que incluían semillas oleaginosas tiene una mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados y mayor nivel de ácido linoléico conjugado. Por lo tanto, mencionan que es posible tener productos cárnicos de mejor calidad en cuanto a la composición de ácidos grasos benéficos a través de la suplementación con semillas oleaginosas, lo que proporcionaría opciones más saludables para el consumo humano de estos productos.

Johnson (2002), realizó estudios en bovinos de leche donde incluyó en la dieta semillas de colza y algodón, y obtuvo como resultado la reducción de emisiones de metano al ambiente. Sin embargo, esta suplementación en la dieta con semillas oleaginosas tiende a producir más leche por unidad de metano de energía perdida, por lo tanto, la utilización debe ser dada de acuerdo a su aporte nutricional y costo, y no como estrategia para reducir las emisiones de metano al ambiente. Beauchemin *et al.* (2009) utilizaron semillas de girasol, linaza y colza trituradas en la dieta de vacas en producción y mostraron que la adición de semilla de colza triturada reduce la emisión de metano sin afectar la digestibilidad de la dieta y, por lo tanto, la producción de leche. Por el contrario, la inclusión de semilla de linaza y girasol tiene efectos negativos en la digestibilidad y por consiguiente, la disminución en la producción de leche; concluyendo que los efectos sobre la producción de leche deben ser estudiados en un contexto más amplio.

Zhang *et al.* (2007) concluyeron que los suplementos con semillas oleaginosas no tienen efectos adversos sobre el consumo de materia seca ni la utilización de nutrientes. La digestibilidad total de la mayoría de los ácidos grasos de cadena larga se incrementa como resultado de la inclusión de semillas oleaginosas en la dieta de ovejas productoras de leche, lo que se traduce en un incremento de ácidos grasos de cadena larga en leche. Por otra parte, estos autores en estudios previos (Zhang *et al.*, 2006) utilizando semillas de girasol y linaza ricas en linoléico (C18:2) y linolénico (C18:3) en la alimentación de ovejas productoras de leche, indican que se puede alterar el contenido de ácidos grasos en la leche y en el queso debido al aumento de ácidos grasos poliinsaturados.

Las semillas de girasol son una fuente rica de energía, gracias a su alto contenido de aceite, el cual es rico en ácidos grasos poliinsaturados, principalmente ácido linoléico. Los porcentajes de inclusión de semilla de girasol en las dietas de finalización para ganado de engorda es variable, sin embargo, Gibb *et al.* (2004) utilizaron hasta 14 % de la materia seca. Este nivel mejoró los

perfiles de ácidos conjugados y las concentraciones de ácido linoléico en los tejidos sin afectar las características organolépticas de la carne. Similarmente, Rizzi *et al.* (2002), utilizó semilla de girasol en dietas para corderos en engorda bajo condiciones de estabulación, encontrando el mejor resultado con la dieta que contenía 10 % de semilla de girasol, ya que mejoró el rendimiento de la canal, especialmente de la región lumbar; así también, la carne se favoreció con la acumulación de ácidos grasos de cadena larga, especialmente de 18:2. Santos-Silva *et al.* (2003), en un grupo de corderos en pastoreo suplementados con concentrados que incluían semilla de girasol rolada, encontraron un efecto favorable en la composición de ácidos grasos de la canal, ya que las proporciones de *trans* C18:1 (Elaídico) y ácido ruménico fueron más altos, concluyendo que la suplementación de semillas de girasol en la dieta de corderos, las cuales son ricas en ácido linoléico, puede ser una forma efectiva de incrementar la productividad sin reducir el contenido de Ácido linoléico conjugado (CLA) en los tejidos, como ocurre con el uso de concentrados convencionales.

Iván *et al.* (2004) Utilizaron semilla de girasol en dietas para corderos en engorda, observando que dependiendo de la dieta utilizada la semillas de girasol puede funcionar como un anti protozario, siendo esto benéfico para los rumiantes, debido a que una fauna reducida puede contribuir a una eficiencia en la utilización de proteínas de la dieta y el consiguiente ahorro en suplementos de proteína dietética. Otro estudio similar que realizó Iván *et al.* (2001), donde ellos suplementaron aceite de semilla de girasol en corderos de engorda, observando incremento en la concentración de CLA en músculo y tejido subcutáneo, dada la combinación del aceite y forrajes deshidratados que se utilizaron en dichos corderos. Sin embargo, la concentración de C18:2 fue alta en tejido cardiaco, hepático y renal, lo que significa que dietas con inclusión de aceite de semilla de girasol incrementan el CLA y los ácidos grasos de cadena larga en la carne, lo cual es deseable como una perspectiva para la salud humana.

Mir *et al.* (2002) alimentaron ganado de engorda con aceite de semilla de girasol en la dieta, observando disminución en el consumo de la materia seca pero no se observó efecto negativo en la eficiencia alimenticia ni en las características de la canal, sin embargo, tuvo un efecto positivo sobre la aceptabilidad de la carne en anaquel en su venta al menudeo, de la misma manera, el suplemento de aceite de semilla de girasol al 6 % de la materia seca de la dieta, se asocia con el aumento de CLA y el nivel de grasa infiltrada en musculo. Las dietas que incluyen semilla de

girasol, hasta un 15 % del total de la materia seca, ayudan a disminuir los problemas de acidosis y abscesos hepáticos en dietas altas en granos para ganado de engorda (Beauchemin *et al.*, 2007). Otros efectos benéficos que se le han encontrado a la semilla de girasol son reportados por Nagalakshmi *et al.* (2011), quienes mencionan que la incorporación de semillas de girasol a dietas de corderos, no tienen ningún efecto perjudicial en cuanto a parámetros de rendimiento, características de la canal e inmunidad de los corderos en engorda. También tiene efectos mixtos en el perfil de ácidos grasos de la carne de vaca con respecto al contenido de ácidos grasos bioactivos, tales como Isómeros de CLA, ácido vaccénico (11t-18: 1), y 10t-18: 1. La disminución del contenido de grasa en las canales de los animales alimentados con la semilla de girasol mejora el rendimiento magro de las canales (Mirs *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2005) suplementaron semilla de girasol en ganado de engorda hasta un 15 % de la dieta de finalización y no se afectó la percepción sensorial de la carne ni la productividad y el rendimiento. Similarmente, Hopkins *et al.* (2001), alimentando corderos en engorda intensiva, bajo condiciones de pastoreo mixto suplementados con grano de avena y harina de girasol encontraron un pH idóneo de la carne, para su posterior empacado al vacío.

Hristov *et al.* (2005) incluyeron 5 % de aceite de semilla girasol en bovinos y no observaron cambios en la fermentación ruminal, el flujo de proteína microbiana al duodeno y la digestibilidad aparente de nutrientes. Al parecer las diferencias entre el nivel de insaturación del aceite no es suficiente para afectar la composición microbiana del rumen, la fermentación o la digestión de nutrientes.

2.2. Características y producción del girasol y su semilla

Los principales países productores de girasol a nivel mundial durante el 2010 en orden de importancia son: Ucrania, Federación Rusia, Argentina, Francia Turquía, Bulgaria, China, Rumania, Hungría y Estados Unidos de América. En conjunto, estos países sumaron 86 % del total de la producción mundial de girasol pero destaca Ucrania, que aporta 23 % de la producción de esta oleaginosa en el mundo (Figura 1).

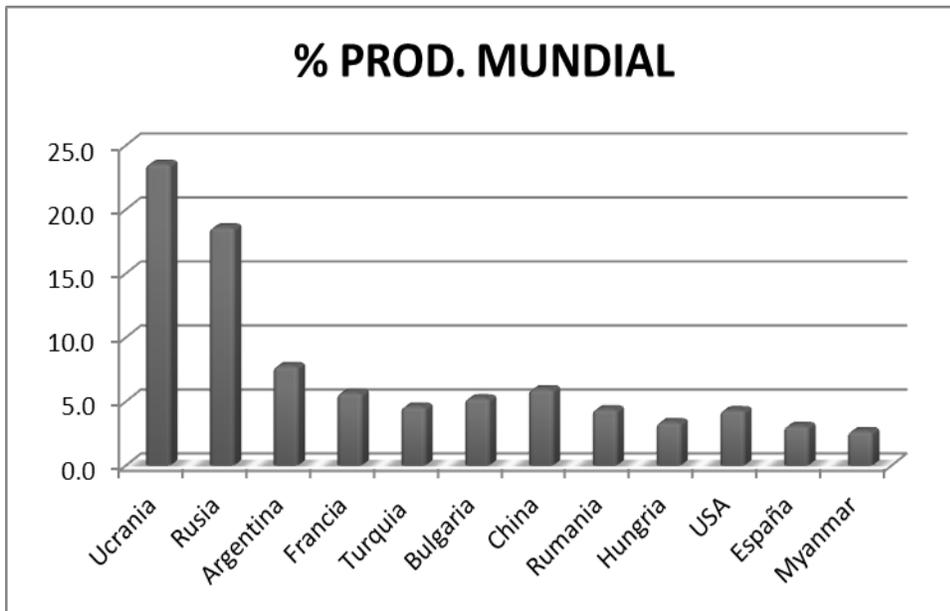


Figura 1 Porcentaje de producción mundial de semilla de girasol

FUENTE: FAOSTAT (2012).

La producción de oleaginosas en México es de 3,797 toneladas, el girasol ocupa el sexto lugar, después de los cultivos de cártamo, soya, cacahuate, ajonjolí y canola (SIAP, 2010). La producción de girasol para semilla enfrenta problemas de competencia con la producción de este cultivo con fines ornamentales y para forraje, de tal manera que la cantidad que se siembra para semilla tiene altibajos notables. La superficie cosechada ha mostrado variaciones en la cantidad de hectáreas cosechadas por año, que no muestran una tendencia clara, por la presencia de años atípicos de baja superficie. Por esta razón, la producción de girasol mexicano no figura en el comercio mundial de oleaginosas, aunque dentro del paquete de granos que se siembran para la producción de aceite, se sabe del déficit del 95 % que se tienen de este tipo de granos.

Los estados con mayor superficie cosechada de girasol del país son Morelos, Nayarit, Baja California Sur y Norte, Campeche y Coahuila, sin embargo, cabe mencionar que este cultivo ha venido perdiendo fuerza, pues existen casos de estados como Tamaulipas y Sonora donde tradicionalmente se cultivaba, en los que ya no se registraron datos de su cosecha en los últimos años. El rendimiento promedio en estos estados ha sido de entre 1.5 y 2.5 t ha⁻¹. El precio promedio rural varió desde los 2,500 pesos hasta los 8,000 pesos por tonelada en el año 2007. En los últimos dos años la superficie cosechada de girasol en el país no ha rebasado las 200 ha, esto en buena medida se debe a la falta de una estrategia de fomento a su producción, (Infoagro, 2012).

El origen del girasol se remonta a 2,500 – 3,000 años A.C. En el norte de México y Oeste de Estados Unidos, debido a que fue cultivado por los grupos indígenas de Nuevo México y Arizona (Lentz *et al.*, 2008). El girasol fue uno de los primeros productos agrícolas empleados en la alimentación por varias comunidades americanas antes de la conquista. La semilla de girasol fue introducida en España por los colonizadores, siendo su principal uso como ornamental y después se extendió al resto del continente Europeo pero fue durante el siglo XIX en Rusia donde se inició el cultivo y la producción industrial de aceite en la alimentación, (Bye *et al.*, 2009).

El girasol (*Helianthus annuus* L.) pertenece a la familia *Asteraceae* que es una planta vigorosa de ciclo anual y existen varias subespecies o tipos, cultivadas como forrajes, para la ornamenta y para la producción de aceite. Siendo sus características físicas más sobresalientes las siguientes: es una planta de altura muy variable 0.7 a 6.0 m, su raíz es de tipo pivotante, con raíces secundarias de las que nacen las terciarias que se desarrollan de manera vertical y horizontal, y la raíz principal sobrepasa la altura del tallo. El tallo es cilíndrico de consistencia semileñosa y macizo, su diámetro varía de 2 a 6 cm de diámetro, este es asurcado, veloso y rugoso en su superficie. Las hojas son ovaladas, grandes y alternas su lamina tiene 3 venas principales, son dentadas y de áspera velloso por ambos lados y miden de 10 a 30 cm de largo y de 5 a 20 de ancho, el color es variable pero va desde el verde amarillento al verde oscuro y su número es variable entre 10 y 50 hojas de acuerdo a la variedad.

La flor o capítulo es grande de aproximadamente 30 cm de diámetro y puede ser de forma plana, cóncava o convexa, este siempre gira hacia la luz del sol. Las flores del capítulo (pétalos amarillos) son estériles, dispuestos radialmente en forma de espiral y su función es atraer a los insectos polinizadores. Las flores del interior se forman por un ovario inferior, dos sépalos y una corola en forma de tubo compuesta por cinco pétalos y cinco antenas unidas a la base del tubo de la corola. El fruto dependiendo de la variedad mide entre 3 y 20 mm de largo y de 2 y 13 mm de ancho. Su pericarpio es duro y fibroso, y queda pegado a la semilla, la membrana seminal crece en el endospermo y forma una película fina que recubre el embrión y asegura la adherencia entre semilla y pericarpio (Alba y Llanos, 1990).

La semilla de girasol contiene una gran cantidad de ácido linoléico, oleico, palmítico, esteárico y otros ácidos grasos insaturados, por lo que las semillas se emplean en dietas indicadas en personas con un alto nivel de colesterol en la sangre, ya que está demostrado que, administrado de forma habitual, se consigue una considerable disminución en el nivel del mismo. Asimismo, las semillas poseen lecitina y ácido caféico, lo que le confiere cierto valor nutricional (Infoagro, 2012).

Del girasol se obtienen dos principales productos, la harina y el aceite, la primera es utilizada en la industria de alimentos ya que su contenido de proteína oscila entre el 40 y 50 %, lo que la hace atractiva para la alimentación del ganado. La composición de la harina de semilla de girasol varía según la calidad de la semilla original y el método de elaboración. En el mercado se vende una gran variedad de productos, desde harinas de escasa y buena calidad. El empleo de harina de girasol rica en fibra se limita a la alimentación de los rumiantes adultos, mientras que la harina sin cáscaras es un concentrado rico en proteína, muy útil y de buena digestibilidad y, en mezclas equilibradas, puede utilizarse abundantemente para toda clase de ganado (FAO, 2012).

Por otro lado, el aceite de girasol es uno de los aceites con mayores beneficios a la salud, por su alto contenido de grasas poliinsaturadas. Otros usos de la semilla de girasol son la elaboración de jabones, cosméticos, detergentes y hasta combustibles en algunos países (Infoagro 2012).

2.3. Técnicas de digestibilidad *in vitro* sus ventajas y desventajas

El valor nutritivo de los alimentos está determinado por la biodisponibilidad de nutrientes y la dinámica de los procesos de solubilización e hidrólisis en el tracto gastrointestinal. Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento que limitan su disponibilidad para el rumiante. Las pruebas *in vitro* determinan la proporción de nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal, y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen (Bruni y Chilbroste, 2001).

La digestibilidad de los ingredientes de la dieta, forrajes u otros componentes puede ser estimada por métodos biológicos, *in vivo*, *in situ* e *in vitro*, el primero muy costoso y difícil en el manejo de los animales pero los demás son más accesibles. En la digestibilidad *in situ* se simulan parte de los procesos digestivos en el rumen, se requiere de menos animales, y para la digestibilidad *in vitro* es más fácil pues la mayor parte del procedimiento se realiza en el laboratorio (Muro, 2007).

La prueba de digestibilidad *in vitro* pretende simular la degradación de un alimento en los pre-estómagos de un rumiante utilizando los microorganismos del rumen y simulando las condiciones anaeróbicas, temperatura, pH y ausencia de luz del sistema rumen-abomaso. La prueba *in vitro* comprende la incubación de la muestra con los microorganismos del rumen en un medio nutritivo mineral y un amortiguador, este tratamiento equivale la digestión ruminal. La cantidad de material orgánico degradado o disuelto esta correlacionado a los valores de digestibilidad *in vivo* por lo que los resultados pueden ser utilizados como índices en pruebas comparativas (Medina, 1996).

2.4. Producción de gas

La técnica de producción de gas se diferencia de otras técnicas *in vitro* e *in situ*, no sólo determina la extensión, sino también la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado, directamente como un producto de la fermentación, principalmente cuando se produce mayor proporción molar de acetato y butirato, e indirectamente desde la neutralización del fluido ruminal (Posada, 2005). Este gas es capaz de empujar el émbolo de la

jeringa o de producir cierta cantidad de presión en los frascos para registrar la lectura en mililitros (mL) de gas, a diferentes horas de incubación e interpretar los datos obtenidos (Williams, 2000). Las primeras pruebas de degradabilidad utilizando la técnica *in vitro* por producción de gas (TIVPG) se realizaron en la Estación Experimental Weende en la Universidad de Goettingen en Alemania y comenzaron antes de 1860 (Rymer, 2000).

La técnica de producción de gas *in vitro* permite determinar la modificación en la paja por los tratamientos químicos y biológicos, así como los efectos de compuestos secundarios en la actividad microbiana ruminal, describir la cinética de fermentación, analizar efectos asociativos de diversos alimentos, examinar el efecto de aditivos en la fermentación ruminal e identificar la composición de gases de la fermentación (Getachew *et al.*, 2005; Posada y Noguera, 2005). Aiple *et al.* (1996) indican que el método de producción de gas fue mejor para predecir la energía neta en ingredientes alimenticios. Pero las respuestas son variables al usar pajas tratadas con hongos de la pudrición blanca (Karma y Zadrazil, 1986) o enzimas fibrolíticas exógenas (Tricarico y Dawson, 2005) en estudios de fermentación *in vitro*. Lo anterior se atribuye a la especificidad enzimática por el sustrato, contenido de humedad en el alimento y la especie de hongo usada para producirlas (Karunananda *et al.*, 1995). Cabe mencionar que esta técnica nos permite la estimación de un gran número de muestras, pocos animales durante períodos largos de tiempo (Williams, 2000).

Los estudios realizados hasta ahora sobre el uso de la técnica de producción de gas *in vitro* se siguen realizando con diferentes forrajes o dietas integrales para poder conocer la cinética de degradación de infinidad de compuestos metabólicos (Muro, 2007).

Hay técnicas de producción de gas desarrolladas para la evaluación de la calidad del alimento bajo dos criterios para medir los volúmenes de gas: (1) el gas medido colectado a presión atmosférica y su volumen es determinado directamente o (2) el gas acumulado medido en un contenedor con un volumen fijo, y el volumen es calculado por los cambios de presión. Las técnicas de gas disponibles son: (a) el método de gas Hohenheim o el método de Menke (Menke *et al.*, 1979); (b) el sistema de desplazamiento de líquidos (Beuvink *et al.*, 1992); (c) método manométrico (Waghorn y Stafford, 1993); (d) sistemas de transductor de presión manual

(Theodorou *et al.*, 1994), computarizado (Pell y Schofield, 1993), y la combinación del transductor de presión y el sistema de liberación de gas (Davies *et al.*, 1995; Cone *et al.*, 1996).

2.5. Desarrollo de la técnica de producción de gas

La medición de la producción de gas como una aproximación a la fermentación ruminal no es nueva. McBee, (1953) describió un método manométrico para medir la producción de gas generado por una mezcla de bacterias ruminales que posteriormente fue sufriendo diferentes modificaciones. Por otro lado Menke *et al.* (1979; 1998) en Alemania describieron un sistema *in vitro* en el cual la producción de gas de un sustrato es usada para la predicción de la digestibilidad y el contenido de energía metabolizable. El método utiliza una jeringa en la cual se incubaba el sustrato en un medio con buffers e inóculo de fluido ruminal. La producción de gas es medida a diferentes intervalos de tiempos por la posición del pistón en la jeringa. Otros investigadores han trabajado en métodos para simplificar y computarizar la medición de gas (Mauricio *et al.*, 1999). Los métodos manométricos fueron superados por el desarrollo de transductores de presión a pequeña escala con el cual es posible monitorear la producción de gas manualmente (Theodorou *et al.*, 1994) o en forma totalmente automatizado (Beuvink *et al.*, 1992; Pell y Schofield, 1993).

Los transductores de presión ofrecen una vía sencilla y precisa de medir la producción de gas. La diferencia más importante en las variantes reportadas Mauricio *et al.* (1999), radica en la evacuación o no, del gas generado durante la fermentación entre los intervalos de medición. Theodorou *et al.* (1994; 1995) reportaron perturbaciones en el crecimiento microbiano por no extraer el gas generado en los diferentes intervalos de tiempo, mientras que los investigadores de la Universidad de Cornell no observaron esta respuesta (Schofield y Pell, 1995). Otra diferencia encontrada en los instrumentos es el principio básico de los sensores unos leen por diferencias con la presión atmosférica (tipo gauge) y otros son los sensores de vacío, los cuales dan lecturas independientes de la presión atmosférica. Todos los transductores miden, las diferencias de presión que se generan en el espacio que queda libre dentro de la botella de incubación, descontándole el espacio ocupado por el tapón y la muestra incubada en la fase líquida (Bruni, 2001).

Para la determinación de la producción de gas es necesario considerar todos los factores que afectan a los sistemas *in vitro* en general, ya que sus efectos alteran tanto la actividad microbiana en forma directa como al gas generado durante la fermentación. Recientemente, se ha publicado una exhaustiva revisión de los principios químicos y físicos que están asociados con el uso de la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1998).

2.5.1. Ventajas de la técnica de producción de gas *in vitro*

- a) Tipo de sustrato: Los henos de leguminosas se degradan a una tasa más alta que los henos con una alta participación de gramíneas (López *et al.*, 1998).
- b) Especie donadora del inóculo: Las diferencias en la actividad de los microorganismos del rumen de diferentes especies, o de la misma especie, pero con diferentes dietas, significó que todas las descripciones de producción de gas deberán describir las condiciones del animal donador (Williams, 2000).
- c) Tampón empleado: Los datos de producción de gas serían más fácilmente interpretados si un sistema tampón basado únicamente en bicarbonato o fosfato fuera utilizado. Sin embargo, para lograr un $\text{pH} > 6$, una mezcla de bicarbonato-fosfato es necesaria (Pell y Schofield, 1993).
- d) pH del medio: Los microorganismos ruminales son muy sensibles a cambios en el pH y la mayoría prefieren un rango de pH entre 6.5 a 6.8. Las bacterias celulolíticas, en particular, son más sensibles a bajos pH que las bacterias amilolíticas (Grant y Mertens 1992a). Hoover *et al.* (1984) demostró que un pH alto (7.5) o bajo (5.5) severamente compromete la digestión de la fibra.
- e) Aditivos nutricionales: Para evitar que factores no fibrosos limiten la fermentación de la fibra, Grant y Mertens (1992b) recomiendan utilizar aditivos nutricionales para asegurar la máxima digestión, especialmente con sustratos bajos en proteína y microminerales.
- f) Número de microorganismos: Aún que los protozoarios hacen una significativa contribución a la digestión de la fibra, su remoción permite que más bacterias colonicen las plantas, cubriendo el nicho anteriormente ocupado por ellos, demostrando que la actividad de los protozoarios y de las bacterias parece ser intercambiable. Hidayat *et al.* (1993) señalaron que si todos los nichos de degradación disponibles son colonizados por

bacterias o protozoarios, la adición de población complementaria no incrementa la tasa o la extensión de la fermentación.

- g) Dieta del donador: Borba *et al.* (2000) señalan una posible relación inversa existente entre la producción de gas y el porcentaje de proteína de la dieta del donador.
- h) Control de temperatura: la actividad microbiana, el volumen de gas y las presiones cambian con la temperatura, por lo que está debe estar en 39°C (Schofield, 2000).
- i) Agitación: El CO₂ tiene una fuerte tendencia a formar soluciones supersaturadas en medio acuoso. Si esto ocurre, la presión o el volumen obtenidos en las lecturas serán incorrectos. Afortunadamente esta tendencia puede ser reducida por suave agitación ocasional (Schofield, 2000).

2.5.2. Factores que afectan la producción de gas

La técnica de PG (producción de gas) requiere de pocos animales e incluso algunos autores se han enfocado al uso de inóculo alternativo para la incubación *in vitro* substituyendo el líquido ruminal por heces del animal lo cual evita el uso de animales canulados y con ello los costos de mantenimiento de estos (Aiple, 1993; Mauricio, 2001). Otro aspecto importante es la cantidad de material requerida para usar la técnica de PG va de 0.1 a 1 g, lo que la hace apropiada bajo situaciones en las cuales los materiales disponibles son limitados (Williams, 2000). Finalmente, los costos de las pruebas del laboratorio son generalmente más bajos que los requeridos para el mantenimiento de los animales. El equipo inicial requerido puede ser bastante caro para los sistemas automatizados, pero como las horas para la medición se reducen significativamente, los costos del equipo se compensan con los costos de mano de obra en la técnica *in situ* o *in vivo* (Carro *et al.*, 1994; Williams, 2000).

2.5.3 Desventajas de la técnica de producción de gas *in vitro*

La falta de uniformidad en su metodología es un factor que hace difícil comparar resultados de diferentes grupos de investigación. Es necesario conocer los tiempos de colección de inóculo y la dieta del animal donador (Rymer, *et al.*, 2005; Getachew, 2002).

2.6. Degradación de materia seca

Para cuantificar la dinámica de los procesos digestivos se han desarrollado metodologías que han permitido conocer las variaciones en la tasa de pasaje o tiempo de retención en el rumen, entre las cuales se tienen la determinación directa de la tasa de pasaje usada para estudiar factores que afectan el consumo, dinámica de digestión y la forma física del forraje (Laredo y Minson, 1973). Asociado a esto, la determinación indirecta con marcadores, mediante el uso de marcadores solubles en agua o que se adhieran a las partículas del alimento con lo que se realiza la estimación de las tasas de pasaje de la fase líquida o sólida en el rumen.

La técnica *in situ* permite determinar de manera simultánea la muestra que es digerida y la tasa a la cual esta digestión se realiza y es utilizada cuando se requiere información acerca del efecto de las condiciones ruminales y el cambio en el ambiente ruminal sobre la tasa y potencial de degradación de los alimentos (Ruiz y Ruiz, 1990).

Por otro lado, se han propuesto modelos para describir la degradación acumulativa de las diferentes fracciones que componen un alimento en función del tiempo de fermentación ruminal, uno de los más usados es el modelo propuesto por Orskov y McDonald (1979) para el caso de la degradación acumulativa de proteína cruda (PC). Este se basa en la técnica de bolsa ruminal que ha sido utilizada durante muchos años para estudiar la degradación de los forrajes. El proceso que se describe mediante la siguiente ecuación: $y = a + b * [1 - \exp(-c * \text{tiempo})]$, donde (y) cantidad de alimento degradado en el tiempo, (a) degradabilidad inicial que corresponde al intercepto de la ecuación que describe la degradación acumulativa de las diferentes fracciones componentes de un alimento función del tiempo, (b) degradabilidad potencial y se define como la degradación que sufriría un alimento en el ecosistema ruminal, (c) tasa de degradación de un alimento se refiere a la cantidad de substrato que puede ser degradada por unidad de tiempo, (t) tiempo de incubación Orskov y McDonald (1979).

2.7. Producción de ácidos grasos volátiles (AGV)

Las reacciones más importantes que se dan en la fermentación de los carbohidratos fueron resumidas por Wolin (1960) y Hungate (1966) de las que se puede concluir que la cantidad de gas producido depende de la cantidad de hexosas fermentadas, y la proporción molar de los

diferentes AGV producidos. Cambios en el patrón de fermentación que incrementen la proporción de ácido butírico y acético, y disminuya la proporción de propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas. Contrariamente cambios en la estequiometría de las reacciones que aumenten la proporción de propiónico a expensas del butírico y acético, resultarían en menos producción de gas a partir de la fermentación. Por lo que la proporción molar de AGV debe ser tomada en cuenta cuando se realizan comparaciones entre perfiles de producción de gas provenientes de diferentes sustratos (Theodorou *et al.*, 1998).

Una de las limitaciones de la técnica de producción de gas es que el cambio en el perfil de AGV puede causar alteraciones en la relación entre la desaparición de sustrato y la producción de gas, debido a que la producción de CO₂ durante la fermentación de un sustrato proviene de dos fuentes: directo de los pasos metabólicos como la descarboxilación oxidativa del piruvato y de las reacciones de los productos finales de la fermentación (AGV) con el bicarbonato del buffer (producción de gas indirecta) (Beuvink y Spoeltra, 1992). La complejidad de la estequiometría de las diferentes reacciones bioquímicas, que ocurren durante la fermentación, hace que se requiera mayor investigación en este punto, lo que dificulta la interpretación en cuanto al aporte de nutrientes.

3. Justificación

La producción de alimentos pecuarios para consumo humano actualmente se está orientando hacia la producción de alimentos funcionales, debido a que los cambios de hábito en el consumo de alimentos ricos en grasas saturadas han incrementado las afecciones de enfermedades crónicas degenerativas y cardiovasculares en la población humana. En la producción de rumiantes una de las alternativas para la producción de alimentos funcionales que puede ayudar a prevenir o disminuir dichas afecciones es la incorporación de semillas oleaginosas en la alimentación, sobre todo por el contenido elevado de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales de acuerdo con diversas investigaciones (Gibb *et al.*, 2004) pueden modificar el perfil de ácidos grasos de la canal. Considerando que la semilla de girasol tiene un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, sobre todo de ácido linoléico, se espera que su incorporación en dietas para corderos pueda influir en la calidad del contenido graso de la canal.

4. Hipótesis

La incorporación de diferentes niveles (0 a 12 %) de semilla de girasol en pruebas de producción de gas *in vitro* con líquido ruminal y dietas integrales de corderos, modifica el proceso de digestión y fermentación de los nutrientes.

5. Objetivo general

Determinar la producción de gas *in vitro* y su asociación con la digestibilidad de la materia seca en dietas integrales para corderos, elaboradas con semilla de girasol.

5.1. Objetivos específicos

1. Estimar la digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (DIVMS) para cada horario de incubación.
2. Evaluar la producción de gas *in vitro* de la materia seca, materia orgánica y materia seca degradada.
3. Determinar la producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles (AGV).

6. Materiales y métodos

6.1. Localización

El experimento se llevó a cabo dentro de la Unidad Metabólica de Rumiantes y el laboratorio de Nutrición Animal del programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 de la carretera México-Texcoco en Montecillo Texcoco, Estado de México; en las coordenadas geográficas 19° 20' latitud norte y 98° 53' longitud oeste con una altitud de 2250 msnm, (García, 1988).

6.2. Animales y dieta

Para la realización del presente estudio se utilizaron tres ovinos machos encastados de raza Suffolk, con un peso vivo de 60 ± 7.6 kg, la dieta de estos animales fue basada en una proporción 30 % forraje y 70 % concentrado, estos animales cuentan con cánula ruminal Tygon-R3603®. Antes de iniciar con el experimento a los tres borregos se les desparasito con Ivermectina (Ivomec-F®, Merial), se les aplico una bacterina (bobact 8® Intervet/Schering Plough Animal Health), y fueron alojados en un corral de 30 m², con piso de concreto, agua al libre acceso y dos horarios de alimentación por la mañana y por la tarde.

6.3 Preparación de las dietas experimentales con inclusión de semilla de girasol

Se elaboraron cinco dietas isoenergéticas e isoproteicas, con diferentes porcentajes de inclusión de semilla de girasol (Cuadro 1)

Cuadro 1. Composición de las dietas

Ingredientes	% Inclusión de semilla de girasol				
	0	3	6	9	12
Maíz, grano	59	58	57	57	56
Salvado de trigo	15	15	14	13	12
Pasta de soya	9	8	7	6	15
Rastrojo de maíz	10	9	9	8	8
Melaza	4	4	4	4	4
Urea	1	1	1	1	1
Piedra Caliza	2	2	2	2	2
Semilla de girasol	0	3	6	9	12
Total	100	100	100	100	100

Cuadro 2. Composición nutrimental de las dietas

Ingredientes	% Inclusión de semilla de girasol				
	0	3	6	9	12
Materia seca, %	81.70	82.55	82.81	83.67	83.94
Energía neta de mantenimiento, Mcal ^{-kg}	2.03	2.01	1.99	1.98	1.96
Energía neta de ganancia, Mcal ^{-kg}	1.38	1.36	1.34	1.33	1.31
Energía metabolizable, Mcal ^{-kg}	2.99	2.96	2.94	2.90	2.86
Energía digestible, Mcal ^{-kg}	3.64	3.53	3.42	3.32	3.21
Proteína, %	16.74	17.04	17.22	17.43	17.62
Proteína disponible rumen, %	66.52	62.92	59.29	55.63	52.16
Proteína no disponible en rumen, %	33.48	37.08	40.71	44.37	47.84
Extracto etéreo	3.23	3.20	3.16	3.14	3.10
Cenizas, %	5.12	5.17	5.27	5.31	5.41
Carbohidratos no estructurales, %	55.96	55.34	54.41	54.17	53.23
Fibra detergente neutro, %	19.46	19.71	20.25	20.25	20.79
Ca, %	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
P, %	0.42	0.43	0.44	0.45	0.46
K, %	0.95	0.94	0.93	0.91	0.90
Mg, %	0.21	0.22	0.23	0.24	0.25
Se, %	0.15	0.15	0.14	0.13	0.13
Co, ppm	0.27	0.27	0.26	0.26	0.26

Mcal/kg, Mega calorías por kilogramo; Ca, calcio; P, fosforo; K, potasio; Mg, magnesio; Se, selenio; Co, cobalto; ppm, partes por millón

6.4. Recolección del líquido ruminal

Para la recolección del líquido ruminal, se utilizó una sonda ruminal en forma de “Y”, un Matraz Erlenmeyer de 500 ml a temperatura de 39°C, cubierto con papel aluminio, conectado al extremo inferior de la sonda ruminal, un extremo corto de la sonda se introdujo a través de la cánula ruminal del animal. Por el otro extremo, se realizaba el vacío para la salida del líquido ruminal y posteriormente se filtró a través de cuatro gasas y un colador de plástico, colocándose en un

termo de plástico (Colleman®), manteniéndolo a una temperatura constante de 39°C, para transportar el líquido ruminal al laboratorio de Nutrición Animal.

6.5. Preparación de reactivos

Los reactivos utilizados fueron solución buffer: Bicarbonato de amonio (Fisher, A643-500), Bicarbonato de sodio (Sigma, S5761), disueltos en agua destilada, la preparación de estos reactivos aparecen en el anexo 1. Solución micro mineral: Fosfato de sodio bibásico, Fosfato de potasio monobásico (Sigma, P5379-1 kg), Sulfato de magnesio heptahidratado y agua destilada, la preparación de estos reactivos aparecen en el anexo 2 Solución macro mineral: Cloruro de calcio dihidratado (Sigma. C3306), Cloruro de manganeso tetrahidratado (Sigma. M8054-500 g), Cloruro de cobalto hexahidratado (Sigma. C-3169), Cloruro férrico (Sigma.F7134-1 kg), la preparación de estos reactivos aparecen en el anexo 3 Solución reductora: Sulfato de sodio anhidro (Sigma. S-6264), 0.1 N NaOH y agua destilada, la preparación de estos reactivos aparecen en el anexo 4 además de resarsurina (Sigma. R-2127), la preparación de estos reactivos aparecen en el anexo 5.

6.6. Preparación del inóculo

La solución de macro y microminerales, así como la solución reductora, se prepararon un día antes del montaje de la técnica, y se mantuvieron a 39°C en un baño maría (Felisa Thermo Baño). Al momento de realizar la técnica, se mezclaron las soluciones en un matraz volumétrico de 6 L utilizando una platina magnética (Thermo Scientific Cimarec Mod. SP131635) y un agitador magnético para mantener la temperatura y asegurarnos de que se mezclen completamente las soluciones. Una vez preparada la solución, se le agregó agua destilada, el líquido ruminal y flujo constante de CO₂. La preparación aparece en el Anexo 6.

6.7. Preparación de los viales

Se utilizaron viales de vidrio de 120 mL, a éstos se les agregó 0.5 g. de muestra de la dieta y se les adicionó 40 mL de inóculo, así como un flujo constante de CO₂ y se fueron tapando con tapones de hule y se sellaron con arillos de aluminio, para ser colocados en incubación dentro de un baño maría (Felisa Thermo Baño) a 39°C, se cubrió el baño maría con un plástico negro para mantener los frascos protegidos de la luz directa.

6.8. Medición del gas

Las lecturas se hicieron a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación, durante el proceso se utilizó un aparato de desplazamiento de agua (Fedorak and Hruday, 1983). Este se diseñó con un soporte universal, un embudo cónico y una bureta de 100 mL y dos mangueras de látex de aproximadamente 1 m y 0.5 m de longitud y diámetro de 3/8 de pulgada. Los viales fueron punzados con una aguja calibre 16 y se midió la producción de gas por desplazamiento de agua en la bureta.

6.9. Métodos analíticos

6.9.1. Obtención de la materia seca

En cada uno de los horarios de muestreo se retiraron viales para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS). Estos viales al sacarlos del Baño maría, se colocaron 5 minutos en congelación con la finalidad de parar la acción bacteriana y después se almacenaron en refrigeración para su conservación. El contenido de cada vial se fue colocando dentro de un tubo plástico para centrifuga (Labcon North America de 50 mL) previamente regulado a peso constante en una estufa (Ríos Rocha Mod. NCF-62) a 55°C, identificados y pesados en una balanza analítica (OHAUS mod. GA200) y se centrifugó (Beckman J2-HS centrifuge), a 11,180 g durante 10 min, posteriormente del sobrenadante se tomó una muestra para la determinación de AGV y se eliminó el sobrenadante por decantación. El vial se enjuagó con agua destilada hasta coleccionar todas las partículas de la muestra a través de diferentes pasos de centrifugación. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y los tubos con la materia seca (MS) se metieron en una estufa (Ríos Rocha Mod. NCF-62) a 55°C durante tres días, con la finalidad de eliminar la humedad en su totalidad, posteriormente se pesaron para obtener por diferencia la materia seca residual. En el último paso se colectó la MS de cada tubo y fue molida en un molino (Thomas Wiley Laboratory Mill Mod. 4) con malla de 1mm para sus análisis posteriores de humedad, cenizas y proteína (Anexo 2).

6.9.2. Preparación de muestras para AGV

Se siguió la técnica descrita por Erwin *et al*, (1961) donde se tomaron 1.6 mL del sobrenadante después de la primera centrifugada a 11,180 g durante 10 minutos del contenido de los viales, esta muestra se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL y se les agregó 0.4 mL ácido metafosfórico al 25 % peso/volumen. Se guardaron en refrigeración para su posterior análisis por cromatografía. Las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga modelo. Hettichzentrifugen EBA 21, a 12,879 g durante 10 minutos, y se leyeron en un Cromatografo Hewelt Packard mod. 6890 puerto de inyección 7386 con muestreador automático, la columna capilar HP-FFAP

longitud 30 m, diámetro interno 0.25 mm y película de 0.25 micras. Temperatura del inyector 210°C, detector 230° C con un flujo de hidrogeno de 35 mL/minuto y un flujo de aire de 350 mL/minuto y como gas acarreador nitrógeno a 14 mL/minuto y el horno con una rampa de temperatura inicial 70°C/minuto, luego 150°C/1.5 minutos, siendo una corrida de 5.50 minutos.

6.10. Diseño experimental

Se usó un diseño completamente al azar con bloques generalizados las dietas elaboradas con semilla de girasol se analizaron como tratamientos utilizando cinco repeticiones por tratamiento en cada bloque y cada bloque correspondió a una incubación. Las variables respuesta de cinética de producción de gas fueron: volumen máximo de gas (V_{max} ; mL g⁻¹), además de desaparición de materia seca *in vitro* (DIVMS), ácidos grasos volátiles (AGV). Se utilizó el procedimiento PROC MIXED de SAS 2002, para el análisis de la varianza. Se realizaron polinomios ortogonales para probar el efecto lineal y cuadrático por el incremento gradual de semilla de girasol. La comparación de medias se efectuó con la prueba de Tukey ($P \leq 0.01$) (Steel y Torrie, 1992). Tanto para la prueba de digestibilidad *in vitro*, como para la producción de gas *in vitro* de la materia seca, materia orgánica, materia seca degradada y AGV.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \zeta_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ijk} = variable respuesta (V_{max} ; mL g⁻¹; DIVMS, AGV)

μ = media general

ζ_i = efecto del i-ésimo tratamiento (dietas)

β_j = efecto del j-ésimo bloque (incubación)

ϵ_{ij} = error aleatorio

$ij = 1, 2.$

7. Resultados y Discusión

7.1 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Los valores de digestibilidad *in vitro* de la materia seca se presentan en el Cuadro 2. Aunque la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) a las 6, 12, 24 y 48 h, no se afectó ($P>0.05$) por la inclusión de semilla de girasol en la dieta (Cuadro 2) al igual que en otras investigaciones con semillas de oleaginosas (Machmueller *et al.*, 2000). De una manera similar la suplementación con semilla de linaza en vacas Holstein, no tuvo ningún efecto sobre la digestibilidad ruminal de la materia seca, materia orgánica, fibra detergente neutro, proteína cruda y ácidos grasos volátiles, al incluirlo al 12.6 % en la dieta en base seca. (Gonthier *et al.*, 2004) Por otra parte en un trabajo realizado con aceite de semilla de colza al 7 % Ben Salem, *et al.* (1993) observaron la falta de efecto en la suplementación con dieta a base forraje: concentrado 60:40 (F: C), en base seca, ya que el aceite de colza disminuyó la digestibilidad de la fibra en vacas alimentadas con ensilado de maíz. Contrariamente a lo anteriormente descrito, en otro estudio donde se utilizó semillas de cártamo, en la alimentación de vacas lactantes, la digestibilidad total de FDN así como la MO no se afectó por la alimentación de la semilla de cártamo hasta una inclusión del 5 % de la materia seca en la dieta (Alizadeh *et al.*, 2010).

A las 72 h de incubación se presentó una disminución lineal ($P=0.03$) en la DIVMS por el incremento gradual de semilla de girasol en la dieta; obteniendo un promedio total de digestibilidad en las dietas elaboradas con semilla de girasol (75.65 %) 0.36 % menor que el tratamiento testigo (75.92 %). Este porcentaje de digestibilidad, coincide con lo reportado por Molina *et al.*, (2003), quienes al utilizar harina de girasol para determinar la digestibilidad entre ovinos y caprinos, encontraron que la degradabilidad ruminal fue mayor y similar entre ovejas y cabras, con valores de 78 y 75 % respectivamente. Adicionalmente, en el mismo horario de incubación (72 h), también se presentó un disminución cuadrática ($P=0.01$) por efecto del incremento gradual de semilla de girasol, la cual se presentó principalmente al incluir 12 % de semilla de girasol (71.67 %); observándose los valores más altos de digestibilidad con 3 y 6 % de semilla de girasol, mientras que con 12 % esta variable disminuye en aproximadamente 6 unidades porcentuales.

La disminución lineal y cuadrática en la DIVMS que se presentó las 72 h de incubación por la inclusión creciente de semilla de girasol se pudo deber al aumento en el contenido de ácidos insaturados de las dietas (Arija *et al.*, 1999). Al respecto, varios investigadores (Beauchemin *et al.*, 2007; Calsamiglia *et al.*, 2007) en pruebas *in vitro* han reportado una disminución en la digestibilidad ruminal por efecto del incremento de ácidos grasos poliinsaturados, debido a que pueden ser potencialmente tóxicos para los microorganismos del rumen (Church, 1988; Iván *et al.*, 2003), Debido a que los ácidos grasos poliinsaturados ejercen un efecto tóxico en bacterias celulolíticas (Nagaraja *et al.*, 1997) y en los protozoarios (Doreau y Ferlay, 1995). Este efecto es probablemente el mecanismo mediante el cual a través de una acción en la membrana celular, es principalmente sobre las bacterias Gram-positivas (Martin *et al.*, 2008). En general, las bacterias Gram-positivas parecen ser más susceptibles a la inhibición por los compuestos de aceites esenciales de plantas en comparación con las bacterias Gram negativas (Davidson y Naidu, 2000). Este efecto se ha relacionado con la presencia de una membrana externa de organismos Gram negativos, que les proporciona una superficie hidrófila bacteriana que actúa como una barrera de impermeabilidad fuerte (Nikaido, 1994). Sin embargo, se desconoce si las cantidades de ácidos grasos poliinsaturados contenidos en la semilla de girasol utilizado en este estudio podrían haber afectado a las actividades de las bacterias celulolíticas en el líquido ruminal. Esto coincide con los resultados encontrados por otros investigadores quienes reportan que la alimentación con semilla de girasol comprimida en 10.6 % de inclusión de la MS se disminuyó drásticamente la digestibilidad de MS y MO en el 19.7 y 15.4 %, respectivamente (Beauchemin *et al.*, 2009). Además, la inclusión de aceite de semillas de girasol (6 % de MS) reduce el número de protozoarios en el fluido ruminal dentro de 5 d (Iván *et al.*, 2001), lo que sugiere que las semillas oleaginosas dentro de alimentación de rumiantes, son ingredientes potenciales para controlar las poblaciones de protozoarios en rumiantes y esto puede ser usado para aumentar la eficiencia en la utilización de proteínas de la dieta.

Por ello, es importante señalar que estos resultados *in vitro* tienen que ser evaluados en condiciones *in vivo* (Jiménez-Peralta *et al.*, 2011) no solamente para corroborar los resultados negativos presentados en el Cuadro 2 sino también para valorar otros efectos ruminales

benéficos, como puede ser una menor producción de metano, debido a una inhibición en la fermentación ruminal sobre todo del proceso de metanogénesis ruminal (Casalmiglia *et al.*, 2007); lo cual favorecería el proceso de eficiencia de la fermentación ruminal (Calsamiglia *et al.*, 2007; Iván *et al.*, 2001, Iván *et al.*, 2003; McAllister y Newbold, 2008), aunque estos resultados no siempre son constantes (Johnson *et al.*, 2002).

Asimismo, la menor DIVMS del tratamiento con 12 % de semilla de girasol a las 72 h también se pudo deber a una menor disponibilidad de N de la dieta (52.16 % vs 66.52 % del tratamiento testigo (Cuadro 2), dado que cuando se tiene un menor contenido de nitrógeno degradable se puede inhibir el crecimiento microbiano (Hegarty, 1999), y por consiguiente, disminuir la capacidad hidrolítica de los microorganismos del rumen (Vant Soest, 1982).

Cuadro 3 Digestibilidad (%) in vitro de la materia seca de una dieta elaborada con semilla de girasol

Incubación, h	Inclusión de semilla, %					EEM ¹	p ²	
	0	3	6	9	12		Lineal	Cuadrático
6	46.99	50.78	48.26	45.20	47.58	2.02	0.50	0.68
12	57.47	59.46	54.13	50.42	60.18	2.64	0.67	0.12
24	67.37	69.04	70.04	69.50	69.46	2.03	0.49	0.55
48	75.92	79.42	78.04	76.43	76.60	2.12	0.81	0.42
72	75.92	77.23	77.66	76.20	71.67	1.29	0.03	0.01
Parámetros de cinética								
a + b	78.12	77.40	75.86	74.99	73.22			
c	0.07	0.08	0.07	0.08	0.09			

¹Error estándar de la media.

²Probabilidad de un efecto significativo (efecto lineal y cuadrático).

^{abc}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P <0.05).

7.2 Producción de gas *in vitro* por gramo de MS incubada

Los valores de producción de gas *in vitro* por gramo de MS incubada se presentan en el Cuadro 3. En él se observa que el incremento gradual de semilla de girasol en la dieta no afectó ($P>0.05$) la producción de gas *in vitro* por gramo de MS incubada, ya que se obtuvo un promedio total de 325.9 mL de producción de gas en las dietas elaboradas con semilla de girasol, en comparación con los 330.9 mL del tratamiento testigo. Estos resultados coinciden con los reportados por Iván *et al.* (2001) y Mir *et al.* (2003) quienes al utilizar 6 % de aceite de semilla de girasol en una dieta para ovinos, no encontraron incrementos en la producción de gas en una prueba de fermentación *in vitro*. Cabe señalar que el nulo efecto en la producción de gas *in vitro* de este estudio contrasta con el incremento en la producción de gas *in vitro* reportado por otros investigadores (Casalmaglia *et al.*, 2007; Jimenez-Peralta *et al.*, 2011), cuando utilizaron como aditivos extractos de plantas con metabolitos secundarios para modificar el proceso de fermentación ruminal. Otro factor que pudo haber ocurrido en el sustrato (contenido de rastrojo de maíz) podría ser lo que mencionaron Doane *et al.* (1997) en sustratos con forrajes y altas concentraciones de FDN (rastrojo de maíz y paja de trigo) teniendo menor proporción de gas (32 %) en comparación con la velocidad específica de otros forrajes (Alfalfa y cebadilla). En otro experimento (Bruni, 1997), que tenía por objetivo, evaluar el efecto de diferentes estrategias de suplementación con energía rápidamente fermentable, sobre los parámetros de la cinética de producción de gas de ensilajes de alfalfa, registró la producción de gas de los ensilajes de alfalfa, con la adición de glucosa en diferentes estrategias y también se registró la curva de producción de gas de glucosa sola. Utilizando la técnica de sustracción de curvas se pudo obtener los efectos de las diferentes estrategias de suplementación sobre la cinética de fermentación de los ensilajes. La suplementación afectó significativamente la tasa específica de producción de gas del pool rápido (SA) y el tiempo Lag (L), mientras que la adición de glucosa promovió una mayor utilización del sustrato, debido a un aumento de la tasa específica de producción de gas (Contraste = Control vs tratamientos suplementados). Los resultados demuestran a la energía como limitante para la utilización del sustrato bajo estudio. La mejora observada puede ser explicada por las características de los componentes no fibrosos del ensilaje: los carbohidratos rápidamente fermentables presentes en el forraje original han sido consumidos durante la fermentación en el proceso de ensilado, con lo que el ensilaje se convierte en un alimento

deficitario en fuentes de energía rápidamente fermentable para los microorganismos ruminales. Cuando se adicionó glucosa en forma tardía se obtuvieron mayores tasas específicas de producción de gas del pool que se fermenta más rápidamente, comparado con los tratamientos de suplementación temprana. Esta situación podría ser explicada por el agotamiento de las escasas fuentes de energía rápidamente disponibles que contiene el ensilaje.

Cuadro 4 Producción de gas *in vitro* (mL) por gramo de materia seca de una dieta elaborada con semilla de girasol

Incubación, h	Inclusión de semilla, %					EEM ¹	p ²	
	0	3	6	9	12		Lineal	Cuadrático
6	108.0	107.2	108.2	106.9	107.1	1.76	0.72	0.95
12	194.3	194.9	191.1	194.3	190.1	5.64	0.49	0.86
24	265.0	266.7	256.4	265.2	257.4	7.52	0.38	0.99
48	311.6	313.0	301.3	313.5	300.8	9.32	0.44	0.86
72	330.9	333.1	319.6	328.1	318.2	10.0	0.31	0.95
Parámetros de cinética								
a + b	327.6	329.9	310.9	322.9	314.3			
c	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07			

¹Error estándar de la media..

²Probabilidad de un efecto significativo (efecto lineal y cuadrático).

^{abc}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P <0.05).

Por otro lado, la falta de respuesta en la producción de gas *in vitro* por efecto de inclusión de semilla de girasol, se pudo deber a una posible inhibición de la metanogénesis (Casalmiglia *et al.*, 2007) ocasionada por el incremento gradual de los ácidos grasos poliinsaturados en las dietas con semilla de girasol. Adicionalmente, otros investigadores (Getachew *et al.*, 2004) han relacionado incrementos en la producción de gas *in vitro* en dietas con un mayor contenido de proteína cruda. Sin embargo, en este experimento el contenido isoproteico de las dietas evaluadas en este experimento pudo haber contribuido al nulo efecto en el aumento en la producción de gas *in vitro*.

7.3 Producción de gas *in vitro* por gramo de materia orgánica incubada

La producción de gas *in vitro* por gramo de materia orgánica incubada se presenta en el Cuadro 4. De acuerdo con los resultados obtenidos, la producción de gas *in vitro* por gramo de materia orgánica incubada no se afectó ($P>0.05$) al incrementar gradualmente el contenido de semilla de girasol en la dieta. En donde la producción total promedio de gas *in vitro* por gramo de materia orgánica incubada en las dietas con semilla de girasol fue de 336.55 mL, en comparación con los 343.0 mL del tratamiento testigo. Estos resultados coinciden con los reportados por Iván *et al.*, (2001) y Mir *et al.*, (2003) quienes al utilizar 6 % de aceite de semilla de girasol en una dieta para ovinos, no encontraron incrementos en la producción de gas en una prueba de fermentación *in vitro*.

Cuadro 5 Producción de gas *in vitro* (mL) por gramo de materia orgánica de una dieta elaborada con semilla de girasol

Incubación, h	Inclusión de semilla, %					EEM ¹	p ²	
	0	3	6	9	12		Lineal	Cuadrático
6	108.9	108.5	108.4	109.6	109.6	2.28	0.77	0.80
12	201.9	202.4	197.5	201.2	197.2	4.17	0.49	0.82
24	275.4	277.1	265.0	274.7	267.0	6.19	0.32	0.68
48	323.2	325.1	311.5	321.4	312.0	8.55	0.29	0.74
72	343.9	346.0	330.4	339.8	330.0	9.61	0.21	0.73
Parámetros de cinética								
a + b	340.4	342.7	321.3	334.4	325.9			
c	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07			

¹Error estándar de la media..

²Probabilidad de un efecto significativo (efecto lineal y cuadrático).

^{abc}Media con letra distinta entre líneas son diferentes ($P < 0.05$).

7.4 Producción de gas *in vitro* por gramo de materia seca degradada

La producción de gas *in vitro* por gramo de materia seca degradada se muestra en el Cuadro 5. De acuerdo con los resultados obtenidos la producción de gas *in vitro* por gramo de materia seca degradada a las 6, 12, 48, y 72 h de incubación no se afectó ($P>0.05$) por el incremento gradual de la semilla de girasol en la dieta. Sin embargo, a las 24 h se presentó un incremento lineal ($P=0.08$) en la producción de gas por el incremento gradual de semilla de girasol; lo que representó un incremento promedio de 3.57 % de gas en las dietas elaboradas con semilla de girasol (700.54 mL), en comparación con la dieta testigo (681.1 mL). Uno de los efectos que pudo haber ocurrido es lo que determinaron Rodríguez *et al.*, (2005) en su experimento de la producción de gas acumulado (mL) y de MS fermentada (mL/g) de *Albizia lebbbeck* en el cual ellos observaron un aumento de la acumulación de gas con el tiempo de exposición de las muestras a la acción de los microorganismos. Esto se relaciona con lo informado por Hoover y Miller (1991) acerca de la colonización de la fibra y su degradación. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos por Rodríguez *et al.*, (2004) en estudios realizados en condiciones similares con *Erythrina mysorensis*. Lo anterior puede relacionarse con la composición química de las especies evaluadas, así como con su edad, ya que el incremento de la madurez de la planta aumenta el contenido de lignina y disminuye la producción de gas, así como la velocidad de producción, pues el contenido de celulosa estará menos disponible para la digestión de los microorganismos del rumen (Fondevila *et al.*, 2002). Cabe señalar que el nulo efecto en la producción de gas *in vitro* de este estudio contrasta con el incremento en la producción de gas *in vitro* reportado por otros investigadores (Casalmaglia *et al.*, 2007; Jiménez-Peralta *et al.*, 2011), cuando utilizaron como aditivos extractos de plantas ricos en metabolitos secundarios para modificar el proceso de fermentación ruminal.

Cuadro 6 Producción de gas in vitro (mL) por gramo de materia seca degradada de una dieta elaborada con semilla de girasol

Incubación, h	Inclusión de semilla, %					EEM ¹	p ²	
	0	3	6	9	12		Lineal	Cuadrático
6	279.9	294.1	293.4	296.0	302.6	13.19	0.19	0.77
12	515.7	544.0	529.3	542.4	541.1	21.96	0.49	0.71
24	681.1	687.1	697.5	713.9	723.1	23.78	0.08	0.51
48	823.4	875.0	830.3	869.7	854.4	43.74	0.68	0.76
72	875.9	931.4	880.8	920.6	903.7	32.19	0.77	0.77
Parámetros de cinética								
a + b	871.9	936.1	860.4	915.0	893.8			
c	0.07	0.06	0.07	0.06	0.07			

¹Error estándar de la media.

²Probabilidad de un efecto significativo (efecto lineal y cuadrático).

^{abc}Media con letra distinta entre líneas son diferentes (P <0.05).

7.5 Producción ácidos grasos volátiles

La producción ácidos grasos volátiles *in vitro* de acuerdo con la materia seca degradada se presenta en el Cuadro 6. En dicho cuadro puede observarse que el ácido acético se disminuyó linealmente (P<0.05) por el incremento gradual de semilla de girasol en la dieta. Además, de que con la inclusión de 12 % de semilla de girasol se presentó una disminución cuadrática (P<0.05) en la producción del ácido acético. Asimismo, el ácido propiónico presentó una disminución lineal (P=0.09) por el incremento gradual de semilla de girasol en la dieta. Estos resultados coinciden con lo reportado por Benchaar *et al.* (2008) y Casalmiglia *et al.* (2007), quienes al evaluar en una prueba *in vitro* obtuvieron, en términos generales, una reducción de principalmente acetato y propionato como respuesta a un aumento en la utilización de algunos aceites esenciales o de algunos de sus componentes activos. Los ácidos grasos volátiles son los productos finales de la fermentación microbiana ruminal y representan la fuente principal de

energía metabolizable de los rumiantes (Van Soest, 1982). Por lo tanto, una reducción de su producción sería nutricionalmente desfavorable para el animal.

Asimismo, la producción total de ácidos grasos volátiles presentó una disminución lineal ($P=0.09$) por el incremento gradual de semilla de girasol en la dieta; lo cual coincide con lo reportado por Iván *et al.* (2001) quienes al utilizar semilla de girasol al 6 % en una prueba *in vivo* obtuvieron una menor ($P < 0.05$) concentración total de AGV (mmol L^{-1}) que la del tratamiento testigo. Sin embargo Soder *et al.* (2012) al evaluar el uso de semilla de linaza en incrementos graduales de 0 % 5 % 10 % y 15 % a nivel *in vitro* encontraron que las concentraciones de AGV totales no fueron afectados ($P > 0,05$) por los tratamientos, con un promedio 55.9 mmol / L . Por otra parte la proporción acético propiónico, tuvo un disminución cuadrática ($P < 0.05$), al incluir 12 % de semilla de girasol.

Cuadro 7 Producción ácidos grasos volátiles in vitro de acuerdo con la materia seca degradada de una dieta elaborada con semilla de girasol

Elementos	Inclusión de semilla, %					EEM ¹	p ²	
	0	3	6	9	12		Lineal	Cuadrático
Ácidos grasos volátiles, ($\text{mol } 100 \text{ mol}^{-1}$)								
Acético	57.77 ^a	60.02 ^a	60.25 ^a	59.66 ^a	48.95 ^b	0.73	0.0001	0.0001
Propiónico	24.35	23.59	23.58	23.23	23.51	0.48	0.093	0.344
Butírico	17.2	16.38	16.16	15.68	16.87	0.40	0.445	0.036
AGV total (mmol L^{-1})	80.75	71.67	73.56	77.40	69.36	0.31	0.090	0.731
Ac:P	2.40	2.62	2.63	2.66	2.09	0.18	0.324	0.031

¹Error estándar de la media.

²Probabilidad de un efecto significativo (efecto lineal y cuadrático).

^{abc}Media con letra distinta entre líneas son diferentes ($P < 0.05$).

8. Conclusiones

La semilla de girasol no incrementa la digestibilidad de la MS ni la producción de gas *in vitro* de una dieta con 80 % de concentrado en las concentraciones evaluadas.

Se recomienda realizar pruebas *in vivo* con corderos para evaluar el efecto de la semilla de girasol en la digestibilidad aparente de los nutrientes, en las variables de fermentación ruminal y en la respuesta productiva.

9. Literatura Citada

- Aiple, K. P., Steingass, H. and Drochner, W., 1996. Prediction of net energy content of raw materials and compound feeds for ruminants by different laboratory methods. *Arch. Anim. Nutr.* 23 pp. 1508-1513.
- Alba, A. O. y Llanos, M. C. 1990. El cultivo del girasol. Ed. Agroguias Mundi-Prensa, pp: 41-55.
- Alizadeh, A.R., Ghorbani, G.R., Alikhani, M., Rahmani, H.R., Nikkhah, A., 2010. Safflower seeds in corn silage and alfalfa hay based early lactation diets: A practice within an optimum forage choice. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 155 pp. 18–24.
- Beauchemin, K. A., Mc Ginn, S. M., and Petit, H. V., 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Can. J. Anim. Sci.* 87 pp. 431–440.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Benchaar, C., Holtshausen, L., 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *J. Dairy Sci.*, 92 pp. 2118–2127.
- Ben Salem, H., Krzeminski, R., Ferlay, A., Doreau, M., 1993. Effect of rapeseed oil supply on *in vitro* ruminal digestion in cows: comparison of hay and maize silage diets, *Can. J. Anim. Sci.*, 73 pp. 547-557.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production; *Anim. Feed Sci. Technol.*, 145 pp. 209–228.
- Berthelot V., Bas, P., Pottier, E., Normand, J., 2012. The effect of maternal linseed supplementation and/or lamb linseed supplementation on muscle and subcutaneous adipose tissue fatty acid composition of indoor lambs Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Meat Science* 90 pp. 548–557.
- Bertrand Matthäus., Luciana G. A., 2003. Anti-nutritive constituents in oilseed crops from Italy; *Industrial Crops and Products* 21 pp. 89–99
- Beuvink, J.M. W., Spoeltra, S.F., Hogendorp, R.J., 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feestuffs incubated with buffered rumen fluid. *Netherland Journal of Agricultural Science* 40 pp. 401-407

- Borba A E., Goncalves P M., Vouzela C F., Rego O A and Borba A F., 2000. Effect of donor feeding in the use of alternative sources of inocula in the prevision of digestibility by the gas production method., *Revista Portuguesa de Zootecnia*. 1 pp. 43-50.
- Bruni, M. A., y Chilbroste, P., 2001. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas., *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*., Vol 9 pp: 43-51
- Bye, R., Linares E., Lentz, D.L., 2009. México: Centro de origen de la domesticación del girasol. *Rev. Esp. en Ciencias Químico-Biológicas*. 1 pp. 5-12.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., and Ferret; A., 2007 Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation; *J. Dairy Sci.* 90 pp. 2580–2595.
- Carro, M.D., Lopez, S., Gonzalez, J.S., Ovejero, F.J., 1994. Comparison of laboratory methods for predicting digestibility of hay in sheep. *Small Rumin. Res.* 14 pp. 9–17.
- Church, D. C., Pond, W. G., 1988. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*; México Ed. Limusa, 339-356
- Cone J. W., Van Gelder A. H., Visscher G. J. W, Oudshoorn L., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim Feed Sci Technol* 61 pp. 113-128.
- Davidson, P. M. and Naidu, A. S., 2000. Phyto-phenols. in *Natural Food Antimicrobial Systems*. A. S. Naidu, ed. CRC; Press, Boca Raton, FL. pp 265-293.
- Davis, D.R., Theodorou, M.K., Baughan, J., Brooks, A.E. and Newbold, J.R., 1995. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds *Annal. Zootech.* 44 (Suppl. 1), 36.
- Dayania, O., Dadvarb, P., Afsharmanesha, M., 2011. Effect of dietary whole cottonseed and crude protein level on blood parameters and performance of fattening lambs. *Small Rumin. Res.* 97 pp. 48–54.
- Dixon R.M., Karda1, W., Hosking, B.J., Egan, A.R., 2003. Effects of oilseed meals and grain–urea supplements fed infrequently on digestion in sheep 2. Cereal straw diets, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 110 pp. 95–110.
- Dixon, R.M., Hosking1, B.J., Egan, A.R., Dixon, R.M., Hosking, B.J., Egan, A.R., 2003. Effects of oilseed meal and grain-urea supplements fed infrequently on digestion in sheep 1. Low quality grass hay diets, *Anim. Feed Sci. Technol.* 110 pp. 75–94.

- Doane, P. H., Schofield, P., & Pell, A. N., 1997. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the *in vitro* fermentation of six forages. *J. Anim Sci*, 75 pp 3342-3352.
- Doreau, M., Ferlay, A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the rumen: A review. *Livest. Prod. Sci.*, 43 pp. 97–110.
- Erwin, E.S., Marco, G.J. and Emery, E., 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44 pp. 1768-1771
- FAO. 2012. Animal Feed Resources Information System (AFRIS) 2012. [En línea], <<http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/AFRIS/DATA/398.htm>> (consulta 28 sep 2012).
- FAO., 2012. Produccion mundial de girasol., [En línea], <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>> (consulta 28 sep 2012).
- Fedorak, P. M., and Hrudey S. E., 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Envir. Technol. Lett.* 4 pp. 425--432.
- Fondevila, M., Nogueira-Filho, J.C.M. & Barrios-Urdaneta, A., 2002. In vitro microbial fermentation and protein utilisation of tropical forage legumes grown during the dry season. *Ani Feed Sci Technol.* 95, pp. 1-14.
- Garcia E., 1988. Modificaciones al sistema de clasificación de climática de Koppen, Enriqueta Garcia Miranda, México, D.F. 217 pp.
- Getachew, G., Crovetto, G.M., Fondevila, M., Krishnamoorthy, U., Singh, B., Spanghero, M., Steingass, H., Robinson, P.H. and Kailas, M.M., 2002. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 102: 169-180.
- Getachew, G., Robinson, P. H., DePeters, E. J., Taylor, S. J., Gisi, D. D., Higginbotham, G. E. and Riordan, T. J., 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124:391-402.
- Getachew, G., Robinson, P.H., De Peters, E.J., Taylor S.J., 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds; *Anim. Feed Sci. Technol.*; 111 57–71
- Gibb, D. J., Owens, F. N., Mir, P. S., Mir, Z., Iván, M. and McAllister; T. A., 2004. Value of sunflower seed in finishing diets of feedlot cattle; *J Anim Sci*, 82:2679-2692.

- Gonthier, C., Mustafa, A. F., Berthiaume, R., Petit, H. V., 2004. Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87: 1854-1863.
- Grant R. J. and Mertens D. R. 1992a. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 75: 1581-1587
- Grant, R. J. and Mertens, D. R. 1992b. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 75: 1263-1272
- Grummer, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.*, 74: 3244-3257
- Hegarty, R.S; 1999. Reducing rumen methane emission through elimination of rumen protozoa; *Aust. J. Agric. Res.*, 50, pp. 1321–1327
- Hidayat, C., Hillman, K., Newbold, C. J. and Stewart C. S., 1993 The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation *in vitro*, as determined by microbial gas production. *Anim Feed Sci and Technol.* 42: 193-208.
- Hoover, W. H., Kincaid, C. R., Varga, G. A., Thayne, W. H. and Junkins, L. L.; 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. PH and dilution rate. *J. Anim Sci* 58: 692.
- Hoover, W.H. & Miller, T.K., 1991. Rumen digestive physiology and microbial ecology. *Food Animal Practice*, 7:2, 311-325.
- Hristov, A. N., Kennington, L. R., McGuire, M. A. and Hunt, C. W., 2005. Effect of diets containing linoleic acid- or oleic acid-rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and performance and fatty acid composition of adipose and muscle tissues of finishing cattle. *J. Anim Sci* 83:1312-1321.
- Hungate R. E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York. 533 pp
- Infoagro., 2012. El cultivo del girasol., [En línea], <<http://www.infoagro.com/herbaceos/oleaginosas/girasol.htm>> (consulta 27 sep 2012)
- Iván, M., Entz, T., Mir, P. S., Mir, Z. and McAllister, T. A. 2003. Effects of sunflower seed supplementation and different dietary protein concentrations on the ciliate protozoa population dynamics in the rumen of sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 809–817.
- Iván, M., Mir, P. S., Mir, Z., Entz, T., He, M. L. and McAllister, T. A., 2004. Effects of dietary sunflower seeds on rumen protozoa and growth of lambs *Br J Nutr.* 92, 303–310.

- Iván, M., Mir, P.S., Koenink, K. M., Rode, L.M., Neill, L., Entz, T., Mir, Z., 2001. Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Rumin. Res.* 41 215-227.
- Jiménez-Peralta F.S., Salem, A.Z.M., Mejía-Hernández, P., González-Ronquillo, M., Albarrán-Portillo, B., Rojo-Rubio, R., Tinoco-Jaramillo, J.L., 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livest Sci.* 136 192–200.
- Johnson, K. A., Kincaid, R. L., Westberg, H. H., Gaskins, C. T., Lamb, B. K. and Cronrath J. D.; 2002. The Effect of Oilseeds in Diets of Lactating Cows on Milk Production and Methane Emissions; *J. Dairy Sci.* 85:1509–1515.
- Joyce, T., Wallace, A.J., McCarthy, S.N., Gibney, M.J., 2009. Intakes of total fat, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in Irish children, teenagers and adults, *Public Health Nutr.*, 12 . 156–165.
- Karma, D. N., and Zadrazil, F., 1986. Influence of gaseous phase, light and substrate pretreatment on fruit body formation, lignin degradation and *in vitro* digestibility of wheat straw fermented with *Pleurotus* sp. *Agric. Wastes* 18: 1-17.
- Karunananda, K., Varga, G. A., Akin, D. E., Rigsby, L. L. and Royse, D. J., 1995. Botanical fractions of rice straw colonized by white-rot fungi: changes in the chemical composition and structure. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55: 179-199
- Laredo M.A., Minson D.J., 1973. The voluntary intake, digestibility and retention time by sheep of leaf and stem fraction of five grasses. *Australian J. of Agricultural Research* 24: 875-888.
- Lentz, D. L., De Land P. M., Alvarado, J. L., Somayeh, T. and Bye, R., 2008. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticated in Mexico, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105, (17): 6232-6237 Published.
- LIU Shi-jun, WANG Jia-qil, BU Deng-pan', WEI Hong-yangl, ZHOU Ling-yun and LUO Qiu-jiangz; 2007 The Effect of Dietary Vegetable Oilseeds Supplement on Fatty Acid Profiles in Milk Fat from Lactating Dairy Cows; *Agricultural Sciences in China*, 6: 1002-1008
- López, S., Carro, M.D., González, J.S., and Ovejero, F.J., 1998. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73, 99–113.

- Machmüller, A., Ossowski, D.A., Kreuzer, M., 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 85, 41-60.
- Manso T., Bodas, R., Castro, T., Jimeno, V., Mantecon, A.R., 2009. Animal performance and fatty acid composition of lambs fed with different vegetable oils. *Meat Science* 83: 511–516.
- Martin, C., Rouel, J., Jouany, J.P., Doreau, M., Chilliard, Y., 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, *J. Anim. Sci.*, 86 2642–2650.
- Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S. and Theodorou M K., 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321-330.
- McAllister, T. A., and Newbold, C. J., 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust J Exp Agric.* 48. 7-17.
- McBee, R.H., 1953. Manometric method for evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied microbiology.* 1: 106-110
- Medina, L.J.B., Salinas, C.H.J., Lerma, D.E.C., Martínez, D.R., Yado, P.R., 1995. Digestibilidad *in vivo* del ensilaje de baya madura de calabaza (Cucurbita máxima) con soca de sorgo, urea y melaza en raciones integrales para ovinos. Memoria VII Congreso Nacional De Producción Ovina AMTEO Chapingo, México. pp. 77-81.
- Menke K. H., and Steingass, H., 1998. Estimation of the energetic feed value from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28: 7-55
- Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider, W. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.*, 92: 217 -222
- Mir, P. S., Dugan, M. E. R., He, M. L., Entz, T. and Yip, B. 2008. Effects of dietary sunflower seeds and tylosin phosphate on production variables, carcass characteristics, fatty acid composition, and liver abscess incidence in crossbred steers, *J. Anim. Sci.* 86:3125-3136.
- Mir, P. S., McAllister, T. A., Zaman, S., Morgan Jones, S. D., He, M. L., Aalhus, J. L., Jeremiah, L. E., Goonewardene, L. A., Weselake, R. J. and Mir, Z. (2003). Effect of dietary sunflower oil and vitamin E on beef cattle performance, carcass characteristics and meat quality. *Can. J. Anim. Sci.* 83: 53–66.

- Mir, P. S., Mir, Z., Kuber, P. S., Gaskins, C. T., Martin, E. L., Dodson, M. V., Elias Calles, J. A., Johnson, K. A., Busboom, J. R., Wood, A. J., Pittenger, G. J. and Reeves, J. J., 2002. Growth, carcass characteristics, muscle conjugated linoleic acid (CLA) content, and response to intravenous glucose challenge in high percentage Wagyu, Wagyu × Limousin, and Limousin steers fed sunflower oil-containing diets; *J Anim Sci*, 80:2996-3004.
- Mir, P.S., Iván, M., Mears, G.J., Ross, C.M., Entz, T., Mir, Z., 2005. Effects of dietary protein and sunflower seed supplementation on physico-chemical characteristics of small intestinal digesta and plasma cholecystokinin concentrations in lambs; *Small Ruminant Res* 58 163–173
- Molina, Alcaide, E., Yáñez Ruiz, D.R., Moumen, A., Martín Garcia, A.I., 2003. Ruminal degradability and *in vitro* intestinal digestibility of sunflower meal and *in vitro* digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal Comparison between goats and sheep, *Anim. Feed Sci. Technol.* 110 3–15.
- Muro R.A., 2007. Efectos de la fuente de fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y proteína sobre la cinética de degradación ruminal *In vitro*. Tesis para obtener el grado Doctor en Ciencias. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia.p.85-89.
- Nagalakshmi D., Dhanalakshmi, K., Himabindu, D., 2011 Replacement of groundnut cake with sunflower and karanj seed cakes on performance, nutrient utilisation, immune response and carcass characteristics in Nellore lambs, *Small Ruminant Res* 97 12–20.
- Nagaraja, T.G., Newbold, C.J., Van, C.J., Nevel, D.I., Demeyer. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. P.N. Hobson, C.S. Stewart (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem* (2nd ed.), Blackie Academic & Professional, New York, NY, pp. 523–632.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382–388.
- Orskov, E.R y McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92:499
- Orskov, E.R. 1982. *Protein Nutrition Ruminants*. Academic Press. London.160 pp
- Pell, A. N. and Schofield, P. 1993 Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 76 1063-1073.
- Peng, Y.S., Brown, M.A., Wua, J.P., Liu, Z., 2010. Different oilseed supplements alter fatty acid composition of different adipose tissues of adult ewes. *Meat Science* 85: 542–549

- Posada, S. L. and R. R. Noguera. 2005. "In Vitro Gas Production Technique: A Tool for Evaluation of Ruminant Feeds." *Livestock Research for Rural Development* 17 (4). www.scopus.com.
- Rizzi, L., Simioli, M., Sardi, L., Giorgio, M. P., 2002. Carcass quality, meat chemical and fatty acid composition of lambs fed diets containing extruded soybeans and sunflower seed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 97 103-114.
- Rodríguez, Y., Chongo, B., La O, O., Oramas, A., Scull, I. & Achang, G. 2004. Tamizaje fitoquímico de Eritrina mysorensis y determinación de su potencial nutritivo mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. Estudio preliminar. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 38:161.
- Rodríguez, Y., Chongo, B., La, O., Oramas, A., Scull, I., & Achang, G. 2005. Características químicas de Albizia lebeck y determinación de su potencial nutritivo mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. *Rev. Cubana Cienc. Agric.* 39(3), 313.
- Ruiz, M y Ruiz, A. (1990). *Nutrición de rumiantes: guía metodológica de investigación*. 1ª ed. San José. CR: IICA, 105-139p.
- Rymer C., 2000. The Measurement of Forage Digestibility *In vivo*. In: *Forage Evaluation in Ruminant*. CAB International., 6: 113 – 134.
- Rymer, C., Williams, B. A., Brooks, A. E., Davies, D. R. and Givens. D. I., 2005. "Inter-Laboratory Variation of in Vitro Cumulative Gas Production Profiles of Feeds using Manual and Automated Methods." *Animal Feed Science and Technology* 123-124 Part 1: 225-241.
- Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., Mendes, I.A., 2003. The effect of supplementation with expanded sunflower seed on carcass and meat quality of lambs raised on pasture, *Meat Science* 65 1301–1308.
- Schofield P., 2000. Gas Production Methods. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International., 450 p.
- Shah, M. A., Mir, P. S., Aalhus, J. L., Basarab, J. and Okine, E. K. 2006. Effects of sunflower seed inclusion in finishing diets for steers on performance, carcass characteristics, muscle and adipose fatty acid composition and meat quality. *Can. J. Anim. Sci.* 86: 37–48.
- SIAP., 2012 Produccion agrícola por Estado., [En línea], <<http://www.siap.gob.mx/>> (consulta 29 sep 2012).
- Steel, R. G. D. y Torrie J. J., 1992. *Bioestadística, principios y procedimientos*. 2da. Edición. México Ed McGraw-Hill Book Co. New York. 622 p.
- Theodorou, M.K., Lowman, R.S., Davies, Z.S., Cuddeford, D. & Owen, E., 1998. Principles of techniques that rely on gas measurements in ruminant nutrition. En: E.R. Deaville, E. Owen,

- A.T. Adesogan, C. Rymer, J.A. Huntington & T.L.J. Lawreace (eds.) *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. BSAS Occ. Pub. No. 22. p. 55
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S. and McAllan, A.D.B. and France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197
- Tricarico, J. M. and K. A. Dawson., 2005. Influence of supplemental endoglucanase or xylanase on volatile fatty acid production from ruminant feed by ruminal *in vitro* cultures. *Archiv. Anim. Nutri.* 59 (5): 325-34.
- Van Soest, P.J., 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca, N.Y. USA. pp: 374.
- Waghorn, G.C. and Stafford, K.J. 1993. Gas production and nitrogen digestion by rumen microbes from deer and sheep. *New Zealand J. Agric. Res.* 4, 493, 497
- Williams, B.A., 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford & H.M. Omed (eds.) *Forage Evaluation in Ruminant*. Chapter 10. CAB International. Wallingford, UK. p. 189.
- Wolin, M. J., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J.Dairy Sci.* 43: 1452-1459
- Zhang, R.H., Mustafa, A.F., Zhao, X., 2006. Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127 220–233
- Zhang, R.H., Mustafa, A.F., Zhao, X., 2007. Effects of feeding oilseeds on nutrient utilization by lactating ewes. *Small Rumin. Res.* 67 307–311
- Zinn, R. A. and Owens, F. N., 1986. A rapid procedure for purine measurements and its use for estimating net ruminal protein synthesis, *Can. J. Anim. Sci.* 66;157-166.

10. Anexos

Anexo 1. Preparación de solución buffer

Solución buffer		
Reactivo	Formula	Preparación
Bicarbonato de amonio	NH_4HCO_3	3.195483178 g
Bicarbonato de sodio	NaHCO_3	27.96047781 g
Agua destilada hasta	H_2O	798.87 mL

Anexo 2. Preparación de solución micro mineral

Solución micro mineral		
Reactivo	Formula	Preparación
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13.2 g
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10.0 g
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Cloruro ferrico	FeCl_3	8.0 g
Agua destilada hasta	H_2O	100 mL

Anexo 3. Preparación de solución macro mineral

Solución macro mineral		
Reactivo	Formula	Preparación
Fosfato de sodio dibásico	Na_2HPO_4	4.553564 g
Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	4.952999 g
Sulfato de magnesio hepta hidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.479322 g
Agua destilada hasta	H_2O	798.87 mL

Anexo 4. Preparación de resarsurina

Resarsurina		
Reactivo	Formula	Preparación
Resarsurina		0.1 g
Agua destilada hasta	H ₂ O	100 mL

Anexo 5. Preparación de solución reductora

Solución reductora		
Reactivo	Formula	Preparación
Sulfato de sodio anhidro	Na ₂ SO ₄	0.912 g
Hidróxido de sodio 0.1 N	NaOH	6.4 g
Agua destilada hasta	H ₂ O	160 mL

Anexo 6. Preparación de viales

Preparación del inculo para 120 viales	
Componentes	mL
Solucion macro mineral	798.97
Solución micro mineral	0.40
Solucion reductora	160.00
Solución buffer	798.97
Liquido ruminal	1600.00
Resarsurina	4.11
Agua Destilada	1597.74
Total	3200.00

Anexo 7. Fórmulas.

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{Pérdida de peso (g)}}{\text{g de muestra}} * 100$$

$$\% \text{ de materia seca} = 100 - \% \text{ de humedad}$$

$$\% \text{ de EE (base seca)} = \frac{\text{g de EE}}{\text{g de muestra}} * 100$$

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(\text{Peso crisol} + \text{muestra}) - (\text{Peso crisol} + \text{cenizas})}{\text{Peso de la muestra}} * 100$$

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{ml})(\text{Normalidad del ácido})(1.4)}{\text{Peso de la muestra en gramos}}$$

Los resultados reportados son en base seca y la cantidad de proteína, se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por un factor de 6.25.