

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA Y ECOLOGÍA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**



---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
CHIHUAHUA**

---

**CAPACIDAD ANTI-METANOGENICA DE NITROCOMPUESTOS  
DE ORIGEN SINTÉTICO Y NATURALES**

**POR:**

**M.C. PEDRO ANTONIO OCHOA GARCÍA**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

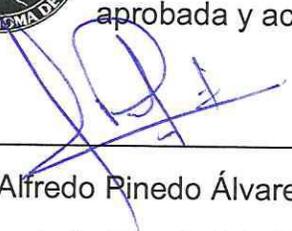
**DOCTOR IN PHILOSOPHIA**

**CHIHUAHUA, CHIH., MÉXICO**

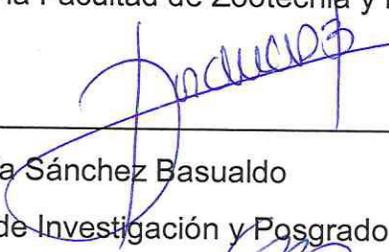
**ENERO DE 2025**



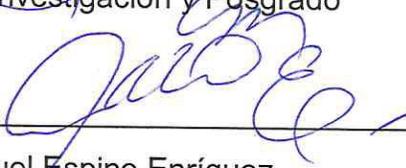
Capacidad anti-metanogénica de nitrocompuestos de origen sintético y naturales. Tesis presentada por Pedro Antonio Ochoa García como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias en Producción Animal y Recursos Naturales, ha sido aprobada y aceptada por:

  
\_\_\_\_\_  
D.Ph. Alfredo Pinedo Álvarez

Director de la Facultad de Zootecnia y Ecología

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Rosalía Sánchez Basualdo

Secretaria de Investigación y Posgrado

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Lauro Manuel Espino Enríquez

Coordinador Académico

  
\_\_\_\_\_  
D.Ph. Agustín Corral Luna

Presidente

  
\_\_\_\_\_  
27 de marzo de 2025

Fecha

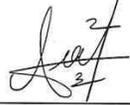
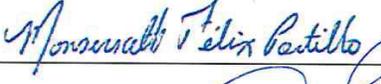


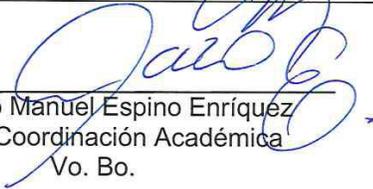
Fecha: 17 de enero de 2025

Después de haber reunido la revisión final del trabajo de tesis a nivel doctorado, bajo el nombre: CAPACIDAD ANTI-METANOGENICA DE NITROCOMPUESTOS DE ORIGEN SINTÉTICO Y NATURALES

Elaborado por: PEDRO ANTONIO OCHOA GARCÍA

Los integrantes del comité están de acuerdo en que dicho trabajo satisface los requisitos para su publicación (indicándolo con una "X"), desde el punto de vista de:

| Puesto en comité                  | Nombre y firma  | Contenido Técnico | Análisis de la Información | Formato (estilo y forma) |
|-----------------------------------|---|-------------------|----------------------------|--------------------------|
| Asesor:                           | Agustín Corral Luna                | X                 | X                          | X                        |
| Co-Director:                      | Alberto Muro Reyes                | X                 | X                          | X                        |
| Representante área menor:         | Martha María Arevalos Sánchez    | X                 | X                          | X                        |
| Representante área estadística:   | Felipe Alonso Rodríguez Almeida  | X                 | X                          | X                        |
| Representante de la coordinación: | Monserrath Félix Portillo        | X                 | X                          | X                        |

  
Dr. Lauro Manuel Espino Enríquez  
Unidad/Coordinación Académica  
Vo. Bo.

X

Fecha actualización: octubre 2024

## **AGRADECIMIENTOS**

Cada paso en el desarrollo de este proyecto ha sido sustentado por el apoyo incondicional de mi esposa, por la motivación de seguir adelante y de ser el mayor ejemplo para nuestros hijos, te agradezco. Extiendo este agradecimiento a mis padres quienes gracias a su orientación y consejo sembraron en mí la calidad humana y el amor al conocimiento.

Agradezco de gran manera a todos mis maestros, todos han sido un peldaño en mi desarrollo profesional, en especial a mi asesor de tesis, por su paciencia, por sus consejos y por todo el apoyo en la culminación de este proyecto. Extiendo este agradecimiento también los Asesores externos e internos del proyecto, así como a los alumnos de licenciatura involucrados en el desarrollo experimental.

Agradezco también el apoyo económico proporcionado por el CONAHCyT a través de la beca No. 481089, a los representantes del comité académico les agradezco todo el conocimiento heredado, a la FZYE y la UACH que me han permitido una educación integral y todas las condiciones adecuadas para la realización de esta tesis.

Gracias a todos.

## DEDICATORIA

Esta obra va dedicada a mi familia, mi esposa e hijos, por el amor, la sinceridad, apoyo y paciencia que me han brindado. Pocos motivos en mi vida he encontrado como el poderles brindar felicidad, paz y amor. Espero que el esfuerzo que se imprime en estas páginas sea un ejemplo para su desarrollo personal y profesional.

Dedico esta obra a mis padres, quienes han estado conmigo en cada paso que doy. A mi padre por sus consejos, por hacer ese esfuerzo y dar su opinión acerca del rumbo que deben llevar las cosas. A mi madre, quien no me permitirá nunca dejar a un lado mi educación. A mis hermanos, que muy a su manera son un apoyo importante.

A mi asesor de tesis que encontró en mí a una persona capaz de llevar a cabo este proyecto. A mis colegas y amigos, quienes han ayudado a que el desarrollo experimental del proyecto pudiera seguir adelante.

Por último, dedico esta obra a la memoria de cada uno mis familiares, quienes ya no se encuentran con nosotros. Quienes con su partida nos han mostrado lo valioso que es brindar un poco de felicidad y apoyo. Me llevo gratos recuerdos y el orgullo de haber formado parte de su familia.

## CURRICULUM VITAE

El autor nació el 20 de julio de 1988 en la Ciudad de Chihuahua, Chihuahua, México.

- |           |  |
|-----------|--|
| 2006-2010 | Estudios de Licenciatura en la Universidad Autónoma de Chihuahua. Facultad de Ciencias Químicas.   |
| 2011      | Coautor de la tesis: "Factores de riesgo asociados a síndrome metabólico en una población de adolescentes menonitas en el municipio de Cuauhtémoc, Chih."<br><br>Ponente en 14vo Congreso de Investigación en Salud Pública y XI Congreso Nacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio. Expo-Lab León 2011. |
| 2011-2012 | Estudiante Graduado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Chihuahua.   |
| 2015      | Estancia de Investigación en el USDA/ARS, Food & Feed Safety Research Unit, en College Station, Texas 77845, USA   |
| 2014-2016 | Estudiante Graduado del Programa de Maestría en Ciencias de la Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua.  |
| 2017      | Co-autor del artículo: Effect of sole or combined administration of nitrate and 3-nitro-1-propionic acid on fermentation and Salmonella survivability in alfalfa-fed rumen cultures <i>in vitro</i>  |
| 2019      | Autor principal del artículo: <i>In vitro</i> reduction of methane production by 3-nitro-1-propionic acid is dose-dependent  |
| 2021      | Autor principal del artículo: Astragalus mollissimus plant extract: a strategy to reduce ruminal methanogenesis  |
| 2024      | Autor principal del artículo: Effect of nitro compounds on <i>in vitro</i> ruminal methane, carbon dioxide, hydrogen and dry matter degradability  |

## RESUMEN GENERAL

### CAPACIDAD ANTI-METANOGENICA DE NITROCOMPUESTOS DE ORIGEN SINTÉTICO Y NATURALES

POR:

M.C. PEDRO ANTONIO OCHOA GARCIA

Doctorado en Ciencias en Producción Animal

Secretaria de Investigación y Posgrado

Facultad de Zootecnia y Ecología

Universidad Autónoma de Chihuahua

Presidente: D. Ph. Agustín Corral Luna

La metanogénesis ruminal es una vía metabólica crucial para mantener la presión parcial del rumen. Sin embargo, esta vía consume entre el 2 y 12 % de la energía consumida por el animal. Desde el punto de vista económico, esto se considera una pérdida de energía para el animal, así como un problema medioambiental grave ya que el metano aquí producido es un gas de efecto invernadero. Por ello, es importante diseñar estrategias encaminadas a su mitigación. Bajo este escenario, el objetivo general de este trabajo fue determinar el potencial antimetanogénico de compuestos nitrogenados tanto de origen sintético como de origen natural. Para ello, se desarrollaron dos estudios bajo condiciones *in vitro*. El estudio 1 consistió en la evaluación de los compuestos sintéticos etilo nitro acetato (ENA), etilo 2-nitropropionato (E-2-NPP) y ácido 3-nitropropionico (3NPA) y su potencial antimetanogénico, así como su efecto sobre la digestibilidad de la materia seca (MS). En este estudio se pudo observar

que la producción total de gas y metano disminuyó en todos los tratamientos con nitrocompuestos ( $P < 0,05$ ). No obstante, la producción total de AGV's fue reducida por ENA y E-2-NPP ( $P < 0,05$ ), pero no por 3NPA. Esto último, es de gran importancia ya que perfila al 3NPA como una estrategia de mitigación viable. Por otro lado, la desaparición de la DM fue similar entre tratamientos, pero disminuyó entre lotes. Como es sabido, la planta *Astragalus mollissimus* es una fuente natural de nitrocompuestos, entre ellos el 3NPA, el cual produce en forma de una miserotoxina compuesta, misma que por acción enzimática libera dichos nitrocompuestos. Así, en un segundo estudio, se evaluó el efecto de la suplementación *in vitro* de un extracto de *A. mollissimus*. En este estudio se observó que la producción de metano se redujo en más del 98% para las muestras tratadas con el extracto de *A. mollissimus* ( $P < 0,05$ ) en comparación con nitrocompuestos sintéticos y el tratamiento control ( $10,2 \pm 0,1 \text{ mmol mL}^{-1}$  de líquido ruminal incubado). Así mismo, los tratamientos con el extracto de AM produjeron una mayor cantidad de AGV totales ( $P < 0,05$ ), en comparación con el resto de cultivos tratados con nitro compuestos sintéticos (2-etil nitroetanol, nitroacetato y nitroetano) y los no tratados. Con estos resultados, es posible concluir que la suplementación de la dieta con *A. mollissimus* podría ser considerada como una alternativa viable para reducir la producción de metano por parte de los rumiantes.

## ABSTRACT

### ANTI-METHANOGENIC CAPACITY OF SYNTHETIC AND NATURAL NITRO COMPOUNDS

BY:

PEDRO ANTONIO OCHOA GARCÍA

Ruminal methanogenesis is a crucial metabolic pathway for maintaining the partial pressure of the rumen. However, this pathway consumes between 2% and 12% of the energy ingested by the animal. From an economic perspective, this is considered an energy loss for the animal, as well as a serious environmental problem since the methane produced is a greenhouse gas. Therefore, it is important to design strategies aimed at its mitigation. In this context, two experiments were conducted to determine the antimethanogenic potential of nitrogen compounds, both synthetic and natural. Study 1 involved the evaluation of the synthetic compounds ethyl nitroacetate (ENA), ethyl 2-nitropropionate (E-2-NPP), and 3-nitropropionic acid (3NPA) for their antimethanogenic potential and their effect on dry matter (DM) digestibility. The study showed that total gas and methane production decreased in all treatments with nitro compounds ( $P < 0.05$ ). However, total VFA production was reduced by ENA and E-2-NPP ( $P < 0.05$ ), but not by 3NPA. This latter finding is highly significant as it positions 3NPA as a viable mitigation strategy. On the other hand, DM disappearance was similar among treatments but decreased across batches. As is well known, the plant *Astragalus mollissimus* is a natural source of nitro compounds, including 3NPA, which it produces as part of a complex miserotoxin. This miserotoxin

enzymatically releases these nitro compounds. In this sense, a second study was conducted to evaluate the effect of supplementation with an *A. mollissimus* extract. This study showed that methane production was reduced by more than 98% in samples treated with the *A. mollissimus* extract ( $P < 0.05$ ) compared to synthetic nitro compounds and the control ( $10.2 \pm 0.1 \text{ mmol mL}^{-1}$  of incubated liquid). Moreover, treatments with the AM extract produced a higher amount of total VFAs ( $P < 0.05$ ) compared to cultures treated with synthetic nitro compounds and untreated controls. These results suggest that supplementation with *A. mollissimus* could be considered a viable alternative for reducing methane production by ruminants

## CONTENIDO

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN GENERAL.....  | vii |
| ABSTRACT.....   | ix  |
| INTRODUCCIÓN GENERAL.....   | 1   |
| LITERATURA CITADA .....   | 4   |
| ESTUDIO I.....  | 7   |
| EFFECT OF NITRO COMPOUNDS ON in vitro RUMINAL METHANE, CARBON<br>DIOXIDE, HYDROGEN AND DRY MATTER DEGRADABILITY ..... | 7   |
| RESUMEN.....  | 8   |
| ABSTRACT.....   | 9   |
| ESTUDIO II.....   | 10  |
| ASTRAGALLUS MOLLISSIMUS PLANT EXTRACT: A STRATEGY TO REDUCE<br>RUMINAL METHANOGENESIS.....                            | 10  |
| RESUMEN.....  | 11  |
| ABSTRACT.....   | 12  |
| CONCLUSIONES E IMPLICACIONES GENERALES.....   | 13  |



## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los rumiantes son animales de producción que desempeñan un papel fundamental en el suministro mundial de alimentos (Chagas *et al.*, 2019). La carne y la leche de rumiantes son ejemplos de alimentos de alta calidad con nutrientes esenciales para la salud humana. Aunque los rumiantes poseen la ventaja de consumir alimentos como son forrajes o esquilmos que no están disponibles para otras especies, gracias a un sistema digestivo distintivo. Este proceso digestivo y sus procesos metabólicos asociados producen metano ( $\text{CH}_4$ ) el cual ayuda a equilibrar la presión parcial de hidrogeno ( $\text{H}_2$ ) en el rumen (Van Nevel, 1996). A pesar de contribuir al equilibrio metabólico en el ambiente ruminal, al ser liberado al medio ambiente el  $\text{CH}_4$  es un potente gas de efecto invernadero (GEI) y uno de los principales causantes del cambio climático global (Pereira *et al.*, 2022). Así mismo, la producción ganadera, especialmente el ganado vacuno (carne y leche), representa una de las principales fuentes de emisiones antropogénicas de  $\text{CH}_4$ , responsable de ~40% de las emisiones totales del sector. Se estima que su concentración en la atmósfera ha aumentado significativamente desde el siglo XIX, alcanzando una concentración >1.883 ppb en 2019, lo que representa un incremento de 257% (IPCC, 2023) lo que sugiere que el impacto del ser humano sobre los ecosistemas se intensificará en los próximos años.

Con el fin de reducir estas emisiones, se han sugerido diversas alternativas, entre las que se encuentran: mejorar la productividad animal a través de mejores prácticas de alimentación (tanto en cantidad como en calidad de



alimento) (McAllister *et al.*, 1996); manejo en pastoreo (McCaughey *et al.*, 1997). No obstante, incrementar la cantidad de concentrado ofrecido puede traer otros problemas de salud como la acidosis, además de incrementar los costos de producción. Otra alternativa que se ha explorado es la modificación del ambiente ruminal por medio de la defaunación (remoción de los protozoos ciliados del rumen), misma que logra una reducción en la producción de metano debido a una disminución de bacterias metanogénicas asociadas a los protozoarios (Machmüller *et al.*, 2000). Sin embargo, la defaunación puede acarrear efectos negativos, como una reducción en la digestibilidad de la dieta. Por otro lado, se ha establecido que los ionóforos pueden reducir hasta un 55% en la producción de metano (O'Kelly and Spiers, 1992). Sin embargo, el efecto no se mantiene debido a la adaptación del medio, lo cual provoca una resistencia a los antibióticos, lo que ha conducido a su prohibición en algunos países (Callaway *et al.*, 2003). Dentro de las estrategias a largo plazo, es posible reducir la producción de metano en las vacas seleccionando razas más eficientes, con reducciones potenciales del 11 al 26% en 10 años (Haas *et al.*, 2011).

Dadas las limitaciones temporales y técnicas de estas prácticas, se han considerado otras alternativas como la intervención química, la cuál consiste en el uso de algunas sustancias químicas directamente en el rumen (Khampa y Wanapat, 2007). Dentro de estas sustancias químicas, se encuentran los análogos del metano y cofactores de la metil coenzima M. De estos compuestos, el mayormente usado es el 3-Nitro oxipropanol (3-NOP). Este compuesto tiene la capacidad de inhibir la actividad de la metil coenzima M reductasa (Duin *et al.*,



2016) y con ello reducir la formación de metano hasta en un 35% (Alvarez-Hess *et al.*, 2019), sin embargo, cuando este es usado en dosis altas (120 mg kg MS) puede reducir el consumo de materia seca en los animales (Melgar *et al.*, 2020).

Por otro lado, tanto las regulaciones gubernamentales para el uso de compuestos sintéticos, como las preferencias de los consumidores, han empujado a la búsqueda de alternativas naturales. En este sentido, el uso de plantas y extractos de plantas se ha popularizado, destacando entre estos el uso de aceites esenciales de diferentes plantas como clavo, eucalipto, ajo, menta (Patra y Yu, 2012) y orégano (Castañeda-Correa *et al.*, 2019). Sin embargo, dado el mecanismo de acción de estos compuestos, su efecto se extiende a toda la microbiota del rumen, esto con efectos negativos, como reducción de la digestibilidad de los alimentos como lo reportan Patra y Yu (2012).

Por lo antes descrito, el objetivo general de este trabajo fue explorar nuevas alternativas de intervención química, para lo cual se usaron nitrocompuestos tanto de origen sintéticos como de origen natural, extraídos de plantas.



## LITERATURA CITADA

- Alvarez-Hess, Pablo S., Shannan M. Little, Peter J. Moate, Joe L. Jacobs, Karen A. Beauchemin, and Richard J. Eckard. 2019. "A Partial Life Cycle Assessment of the Greenhouse Gas Mitigation Potential of Feeding 3-Nitrooxypropanol and Nitrate to Cattle." *Agricultural Systems* 169 (February): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2018.11.008>.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Rychlik, J. L., Genovese, K. J., Poole, T. L., Jung, Y. S., Bischoff, K. M., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2003). Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Current issues in intestinal microbiology*, 4(2), 43–51.
- Castañeda-Correa, A., Corral-Luna, A., Hume, M.E., Anderson, R.C., Ruiz-Barrera, O., Castillo-Castillo, Y., Rodriguez- Almeida, F., Salinas-Chavira, & J., Arzola-Alvarez, C. (2019). Effects of thymol and carvacrol, alone or in combination, on fermentation and microbial diversity during in vitro culture of bovine rumen microbes. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 54, 170– 175. <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1536580>
- Chagas, J. C., Ramin, M., & Krizsan, S. J. (2019). In vitro evaluation of different dietary methane mitigation strategies. *Animals*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/ani9121120>
- Duin, Evert C., Tristan Wagner, Seigo Shima, Divya Prakash, Bryan Cronin, David R. Yáñez-Ruiz, Stephane Duval, et al. 2016. "Mode of Action Uncovered for the Specific Reduction of Methane Emissions from Ruminants by the



Small Molecule 3-Nitrooxypropanol.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (22): 6172–77.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1600298113>.

Haas, Y., Windig, J. J., Calus, M. P. L., Dijkstra, J., de Haan, M., Bannink, A., y Veerkamp, R. F. (2011). Genetic parameters for predicted methane production and potential for reducing enteric emissions through genomic selection. *Journal of Dairy Science*, 94(12), 6122–6134.  
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4439>

Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2023). Climate Change 2021 – The Physical Science Basis. In *Climate Change 2021 – The Physical Science Basis*. Cambridge University Press.  
<https://doi.org/10.1017/9781009157896>

Khampa, Sittisak, and Metha Wanapat. 2007. “Manipulation of Rumen Fermentation with Organic Acids Supplementation in Ruminants Raised in the Tropics.” *Pakistan Journal of Nutrition* 6 (1): 20–27.  
<https://doi.org/10.3923/pjn.2007.20.27>.

Machmüller A, Ossowski DA, 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.  
doi:10.1016/S0377-8401(00)00126-7

McAllister, T. A., Cheng, K. J., Okine, E. K. y Mathison, G. W. (1996). Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in



ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 231-43. <https://doi.org/10.4141/cjas96-035>

Melgar, A., K. Nedelkov, C. M.M.R. Martins, K. C. Welter, X. Chen, S. E. Räisänen, M. T. Harper, J. Oh, S. Duval, and A. N. Hristov. 2020. “Short Communication: Short-Term Effect of 3-Nitrooxypropanol on Feed Dry Matter Intake in Lactating Dairy Cows.” *Journal of Dairy Science* 103 (12): 11496–502. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18331>.

O’Kelly JC, Spiers WW (1992) Effect of momensin on methane and heat productions of steers fed lucerne hay. *Aust J Agric Res* 43:1789–1793. doi:10.1071/AR9921789

Patra, A.K. & Yu, Z. (2012). Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4271–4280. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>

Pereira, A. M., de Lurdes Nunes Enes Dapkevicius, M., y Borba, A. E. S. (2022). Alternative pathways for hydrogen sink originated from the ruminal fermentation of carbohydrates: Which microorganisms are involved in lowering methane emission? In *Animal Microbiome* (Vol. 4, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00153-w>

Van Nevel, C.J. (1996). Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42, 73–97. <https://doi.org/10.1007/BF00394043>



## ESTUDIO I

### **EFFECT OF NITRO COMPOUNDS ON *in vitro* RUMINAL METHANE, CARBON DIOXIDE, HYDROGEN AND DRY MATTER DEGRADABILITY**

Pedro Antonio Ochoa-García<sup>1</sup>, Robin C. Anderson<sup>2</sup>, Felipe Alonso Rodríguez-Almeida<sup>1</sup>, Adrián Omar Maynez-Pérez<sup>1</sup>, Monserrath Felix-Portillo<sup>1</sup>, Alberto Muro-Reyes<sup>3</sup>, Aleksandar K. Božić<sup>4</sup>, Martha María Arevalos-Sánchez<sup>1</sup>, Einar Vargas-Bello-Pérez<sup>1</sup>, Agustín Corral-Luna<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Zootecnia y Ecología. Universidad Autónoma de Chihuahua. Perif. Francisco R. Almada Km. 1, Chihuahua, Chih. México. C.P. 31031.

<sup>2</sup>Food and Feed Safety Research Unit, Southern Plains Agricultural Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 2881 F&B Road, College Station, Texas 77845.

<sup>3</sup>Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, 98500, México.

<sup>4</sup>Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Novi Sad, Republic of Serbia.

\*Corresponding author: [acorral@uach.mx](mailto:acorral@uach.mx)

DOI: <https://doi.org/10.29393/CHJAAS40-18ENPA100018>



## RESUMEN

En este estudio se investigó el efecto de la adición de los nitrocompuestos sintéticos etil nitroacetato (ENA), 2-etil nitropropionato (E-2-NPP) y el ácido 3-nitropropiónico (3NPA) sobre la producción de CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, ácidos grasos volátiles (AGVs), así como la desaparición de materia seca de alfalfa molida bajo condiciones *in vitro*. Los tratamientos adicionando los nitrocompuestos se realizaron en incubaciones *in vitro* en 3 lotes de 24 horas consecutivas. El objetivo del estudio fue determinar los cambios en la producción de H<sub>2</sub>, para identificar las posibles limitaciones en la producción de ácidos grasos derivadas de los cambios en la presión parcial del rumen provocada por este gas. La determinación de CH<sub>4</sub> permite comprobar la proporción de emisiones contaminantes producida y la determinación de gas total permite relacionar el grado de actividad catabólica de las muestras, así como la proporción molar de los gases producidos. La determinación de materia seca y AGVs producidos en cada una de las muestras de estudio permiten comparar los productos del metabolismo resultante de cada uno de los tratamientos. Los resultados mostraron que la producción de gas total y metano se redujeron con todos los nitrocompuestos ( $P < 0,05$ ) en todos los lotes. La producción total de AGVs disminuyó con ENA y E-2-NPP ( $P < 0,05$ ), pero no con 3NPA. La desaparición de materia seca fue similar entre los tratamientos, aunque se redujo entre los lotes. Los resultados encontrados sugieren realizar más estudios para entender el impacto del 3NPA en el metabolismo ruminal y su efecto en modelos *in vivo*.



## ABSTRACT

This study investigated the effect of adding the synthetic nitro compounds ethyl nitroacetate (ENA), 2-ethyl nitropropionate (E-2-NPP), and 3-nitropropionic acid (3NPA) on CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>, volatile fatty acids (VFAs) production, as well as dry matter disappearance of ground alfalfa under in vitro conditions. Treatments with nitro compounds were conducted in in vitro incubations over three consecutive 24-hour batches. The objective of the study was to determine changes in H<sub>2</sub> production to identify potential limitations in VFA production resulting from changes in rumen partial pressure caused by this gas. Methane (CH<sub>4</sub>) determination aimed to verify the proportion of pollutant emissions produced, while total gas determination allowed assessment of the degree of catabolic activity in the samples, as well as the molar proportion of the gases produced. The determination of dry matter and VFAs in each sample enabled comparisons of the metabolic products resulting from each treatment. The results showed that total gas and methane production were reduced by all nitro compounds ( $P < 0.05$ ) in all batches. Total VFA production decreased with ENA and E-2-NPP ( $P < 0.05$ ), but not with 3NPA. Dry matter disappearance was similar among treatments, although it decreased across batches. These findings suggest further studies are needed to understand the impact of 3NPA on rumen metabolism and its effects in in vivo models.



## ESTUDIO II

### **ASTRAGALLUS MOLLISSIMUS PLANT EXTRACT: A STRATEGY TO REDUCE RUMINAL METHANOGENESIS**

Pedro Antonio Ochoa-García<sup>a</sup>, Robin C. Anderson<sup>b</sup>, Martha María Arévalos-Sánchez<sup>a</sup>, Felipe Alonso Rodríguez-Almeida<sup>a</sup>, Monserrath Félix-Portillo<sup>a</sup>, Alberto Muro-Reyes<sup>c</sup>, Aleksandar K. Božić<sup>d</sup>, Claudio Arzola-Álvarez<sup>a</sup>, and Agustín Corral-Luna<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup> Facultad de Zootecnia y Ecología, Universidad Autónoma de Chihuahua. Periférico Francisco R. Almada Km 1, Chihuahua, Chihuahua, 31453, México.

<sup>b</sup> USDA/ARS, Food and Feed Safety Research Unit, 2118 F&B Road, College Station, TX 77845.

<sup>c</sup> Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, 98500, México.

<sup>d</sup> Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, Novi Sad, Republic of Serbia

\*Corresponding author: [acorral@uach.mx](mailto:acorral@uach.mx)

DOI: [10.1007/s11250-021-02882-1](https://doi.org/10.1007/s11250-021-02882-1)



## RESUMEN

Este estudio evaluó el efecto de la suplementación con un extracto de *A. mollissimus* (MISER) en la producción *in vitro* de metano por los microorganismos ruminales. Para lo anterior, se compararon los efectos del extracto de la planta productora de nitrocompuestos naturales, con los compuestos 2-nitroetanol (2-NEOH), etyl 2-nitroacetato (E2NA), o nitroetano (NE) como controles positivos. Controles sin tratamiento fueron preparados únicamente con agua destilada. Las incubaciones *in vitro* fueron analizadas tras un periodo de incubación de 24 horas. Se analizaron los principales productos de la fermentación, CH<sub>4</sub>, AGVs, así como la cantidad y composición de los gases. Los resultados obtenidos mostraron que la producción de metano se redujo en más del 98 % en las muestras tratadas con los extractos de *A. mollissimus* ( $P < 0,05$ ), en comparación con los controles no tratados ( $10,2 \pm 0,1$  mmol mL<sup>-1</sup> de líquido incubado). La producción de AGVs en las incubaciones suplementadas con MISER fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) en comparación con los controles con los nitrocompuestos sintéticos y los controles con agua destilada. Los resultados obtenidos sugieren que los extractos de *A. mollissimus* ofrece una estrategia prometedora para mitigar la metanogénesis ruminal. No obstante, es necesario realizar más investigaciones para determinar si los productos metabolizados son seguros y de utilidad para el animal.



## ABSTRACT

This study evaluated the effect of supplementation with an *A. mollissimus* extract (MISER) on the in vitro methane production by ruminal microorganisms. To this end, the effects of the plant extract, which produces natural nitro compounds, were compared with the compounds 2-nitroethanol (2-NEOH), ethyl 2-nitroacetate (E2NA), and nitroethane (NE) as positive controls. Untreated controls were prepared using only distilled water. The in vitro incubations were analyzed after a 24-hour incubation period. The main fermentation products, CH<sub>4</sub>, VFAs, as well as the quantity and composition of the gases, were evaluated. The results showed that methane production was reduced by more than 98% in the samples treated with *A. mollissimus* extracts ( $P < 0.05$ ) compared to the untreated controls ( $10.2 \pm 0.1$  mmol mL<sup>-1</sup> of incubated liquid). VFA production in the incubations supplemented with MISER was significantly higher ( $P < 0.05$ ) compared to both the synthetic nitro compound controls and the distilled water controls. These results suggest that *A. mollissimus* extracts offer a promising strategy for mitigating ruminal methanogenesis. However, further research is necessary to determine whether the metabolized products are safe and beneficial for the animal.



## CONCLUSIONES E IMPLICACIONES GENERALES

Sin duda alguna, uno de los principales desafíos de la humanidad seguirá siendo producir alimentos para una población en constante crecimiento. Como consecuencia, el uso de recursos y la emisión de gases de efecto invernadero seguirán incrementándose. Sin embargo, también es cierto que cada día existe mas conciencia ambiental entre la sociedad, que busca consumir productos que tengan una menor huella de carbono. En este sentido, desde la producción animal se siguen explorando diversas alternativas que ayuden a mitigar las emisiones de gases de efecto invernadero desde este sector, sin que ello represente una reducción en la producción.

En el Estudio 1 de este trabajo, se demostró que compuestos como el etil nitro acetato y el 2-nitropropionato de etilo tienen una gran eficiencia para reducir la producción de metano *in vitro*, sin cambios en la digestibilidad de la materia seca. Sin embargo, estos nitrocompuestos tuvieron un fuerte efecto negativo sobre la producción de ácidos grasos volátiles, lo cual podría dificultar su uso *in vivo* ya que este efecto negativo muy probablemente se verá reflejado en una baja productividad del animal. Por otro lado, la evidencia aquí encontrada sugiere que el nitrocompuesto mas prometedor es el ácido 3-nitropropiónico. No obstante, se debe estudiar a mayor detalle su efecto en el metabolismo ruminal durante un largo período y su efecto en modelos vivos. La mayor preocupación, además de su alto costo, sobre el uso del ácido 3-nitropropiónico o sus fuentes de origen vegetal como alternativa de mitigación de emisión de metano se debe a sus efectos tóxicos, en particular a su potencial inhibición mitocondrial,



inhibiendo específicamente la enzima succinato deshidrogenasa en la cadena de transporte de electrones, así como una toxicidad neurológica lesiva de las porciones estriatales con efectos similares a los provocados por la enfermedad de Huntington (Se caracteriza por disfunción motora, deterioro cognitivo y síntomas psiquiátricos) (Palfi et al., 1996).

Por otro lado, los resultados del estudio 2, demuestran que la administración de un compuesto natural proveniente de *A. mollissimus* como es el 3NPA, reduce la producción de metano *in vitro*. Así mismo, la reducción en la producción de metano fue comparable a lo observado cuando se usan nitrocompuestos de origen sintético como 2-NEOH, E2NA y NE. Desde un punto de vista práctico, los resultados de este estudio sugieren que la suplementación con el extracto de *A. mollissimus* podría representar una alternativa natural para reducir la producción de metano. No obstante, es de suma importancia determinar las vías de degradación del compuesto, la completa composición del extracto, así como la manera más segura y eficaz de suplementarlo a los animales. Además, de que se requiere de una comprensión más profunda de los efectos de la suplementación con este extracto sobre la población microbiana del rumen. Por otra parte, la domesticación de plantas silvestres como *A. mollissimus* enfrenta desafíos significativos, incluyendo la adaptabilidad genética y ambiental, los ciclos reproductivos (Melgoza et al., 2012). Sin embargo, enfoques alternativos como la selección genética, la agroforestería y las intervenciones biotecnológicas pueden ofrecer caminos para hacer estas plantas más viables para su cultivo o uso controlado. Además, otras plantas como ciertas especies



de *Lupinus*, *Swainsona* y *Oxytropis* también producen 3NPA de forma natural, lo que presenta desafíos similares para su uso en el ganado o en el consumo humano (Takács et al., 2022).

Actualmente las principales opciones seguras y viables que se utilizan para reducir las emisiones de metano en rumiantes son el manejo de la alimentación, como alimentar con forrajes y granos de mayor calidad, así como agregar grasas o aceites a su dieta. Por otra parte, el uso de 3-nitrooxypropanol, compuesto químico inhibidor de metano, es un compuesto ya disponible comercialmente y ha demostrado ser seguro y eficaz (Kebreab et al., 2023; Romero-Pérez et al., 2015), mientras que los taninos así mismo se están utilizando a menor escala como alternativa natural para la reducción de metano. Estos métodos ya se están implementando y su seguridad y eficacia están bien establecidas (Palangui et al., 2022). Sin embargo, la inclusión de plantas como fuente de obtención de compuestos nitrogenados con capacidades antimetanogénicos necesita más investigación. El mayor reto representa determinar el efecto sobre productividad animal, la dosis óptima y segura que asegure la degradación completa del nitrocompuesto y que a la vez garantice la ausencia de residuos en los productos de origen animal como carne y leche.

## LITERATURA CITADA



Kebreab E, Bannink A, Pressman EM, Walker N, Karagiannis A, van Gastelen S & Dijkstra J. A meta-analysis of effects of 3-nitrooxypropanol on methane production, yield, and intensity in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2023 Feb;106(2):927-936. doi: 10.3168/jds.2022-22211.

Melgoza Castillo, A., Royo Márquez, M. H., Morales Nieto, C. R., & Sierra Tristán, J. S. (2012). Germinación de semillas de hierba loca (*astragalus mollissimus* torr) con diferentes niveles de humedad y temperatura. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 41(1). Recuperado a partir de <https://cienciaspecuarias.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/1284>

Palangi, V., Taghizadeh, A., Abachi, S., & Lackner, M. (2022). Strategies to Mitigate Enteric Methane Emissions in Ruminants: A Review. *Sustainability*, 14(20), 13229. <https://doi.org/10.3390/su142013229>

Palfi, S., Ferrante, R. J., Brouillet, E., Flint Beal, M., Doian, R., Guyot, M. C., Peschanski, M., y Hantrayel, P. (1996). Chronic 3-Nitropropionic Acid Treatment in Baboons Replicates the Cognitive and Motor Deficits of Huntington's Disease. In *The Journal of Neuroscience* (Vol. 76, Issue 9). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-09-03019.1996>

Romero-Pérez, A., Okine, E. K., Guan, L. L., Duval, S. M., Kindermann, M., & Beauchemin, K. A. (2015). Effects of 3-nitrooxypropanol on methane



production using the rumen simulation technique (Rusitec). *Animal Feed Science and Technology*, 209, 98–109.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.002>

Takács O, Nagyné A, Boldizsár I, Höhn M, Béni S, Gampe N. Analysis of 3-nitropropionic acid in Fabaceae plants by HPLC-MS/MS. *Phytochemical Analysis*. 2022; 33(8): 1205-1213. doi:[10.1002/pca.3171](https://doi.org/10.1002/pca.3171)