



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**MODULACIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL POR EL  
USO COMBINADO DE ZEOLITA Y ÁCIDO FERÚLICO EN  
DIETA DE OVINOS**

---

Por:

**Ana Laura Tánori Lozano**

TESIS APROBADA POR LA

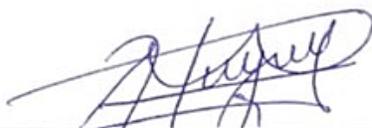
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

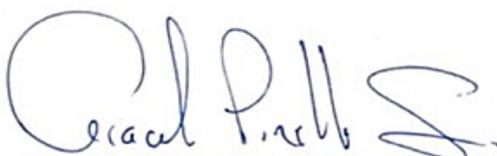
**DOCTORA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ana Laura Tánori Lozano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



Dr. Humberto González Ríos  
Director de Tesis



Dra. Araceli Pinelli Saavedra  
Integrante del comité de tesis



Dra. Maricela Montalvo Corral  
Integrante del comité de tesis



Dr. Martín Valenzuela Melendres  
Integrante del comité de tesis



Dr. José Luis Dávila Ramírez  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Modulación de la Fermentación Ruminal por el Uso Combinado de Zeolita y Ácido Ferúlico en Dieta de Ovinos" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Ana Laura Tánori Lozano, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos

Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por otorgarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.) por admitirme dentro de su programa académico y brindarme las herramientas necesarias para culminar mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis, Dr. Humberto González Ríos, le estoy muy agradecida por la oportunidad que me dio para integrarme a su equipo de trabajo aun conociendo el reto implicado. Le agradezco también toda su paciencia, sus enseñanzas, su confianza, sus consejos y su guía brindada durante mi formación académica y crecimiento personal. Muchas gracias por todo Dr. Humberto.

A todos los miembros de mi comité, Dra. Araceli Pinelli, Dra. Maricela Montalvo, Dr. Martín Valenzuela y Dr. José Luis Dávila, les agradezco mucho todo su apoyo, asesoría y aportes realizados a este proyecto y a mi formación. También les agradezco de todo corazón su confianza en mí para sacar adelante este trabajo de investigación.

A la Q.B. Thalia Y. Islava Lagarda por todo su apoyo técnico, entrenamiento y colaboración en los análisis de laboratorio. Gracias Thalia por todas las asesorías, por tu disposición, los cafecitos y tu amistad a lo largo de estos cuatro años; gracias por pulir mi trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Ángeles López y todo el cuerpo académico de Fisiología y Genética del ICA-UABC por su valiosa colaboración en la segunda etapa experimental, al brindar las facilidades en el uso de instalaciones, materiales y animales, los cuales fueron fundamentales en este proyecto. Gracias Dra. Ángeles por tu apoyo incondicional, orientación, por tus enseñanzas en campo y laboratorio, y por brindarme tu amistad. Gracias por ser un ejemplo.

Le agradezco a mi compañero de laboratorio y amigo Imanol Quintana por su ayuda durante toda la primera etapa experimental. Estoy muy agradecida por haber compartido tanto contigo en este proyecto, tanto académicamente como personal. También, agradezco a mis hermanas académicas Eileen Corral, Leslie Medrano y Alejandra Ospina, así como a mis compañeros del grupo de trabajo LACyTEC Julio González, Nallely Peñuñuri, Ezequiel Hernández, Laura Flores† y Francisco Alday, por toda su ayuda, intercambio de conocimientos, amistad y por compartir experiencias en esta etapa de formación y crecimiento de mi vida. Gracias por todos sus aportes. También me

permiso agradecer a todos los académicos de LACyTEC y profesores de CIAD que estuvieron involucrados directa o indirectamente en mi formación y culminación de este trabajo. Gracias a mis amigos por estar presentes, por toda su paciencia y por sus ánimos.

Por último, pero no menos importante, agradezco infinitamente a mi madre Icela Lozano, a mi padre Moisés Tánori y mi hermana Karina Tánori, quienes me han acompañado incondicionalmente y motivado en cada camino que recorro. Nunca me alcanzarán las palabras para agradecerles todo su amor, su apoyo, sus sacrificios y por todas las herramientas, fortaleza y oportunidades que me han brindado a lo largo de mi vida para forjar quien ahora soy. Gracias por ser una figura de esfuerzo y superación, mi amor y orgullo por siempre estará con ustedes.

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>CONTENIDO</b> .....	6
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1. SINOPSIS</b> .....	9
1.1. Justificación .....	9
1.2. Antecedentes.....	11
1.2.1. Producción de Carne de Ovinos de Pelo en México.....	11
1.2.2. Estrategias Nutricionales Para la Producción de Carne de Ovinos de Pelo.....	13
1.2.3. Modulación de la Fermentación Ruminal.....	14
1.2.4. Estrategias Nutricionales Para Modular la Fermentación Ruminal.....	15
1.2.5. Ácido Ferúlico en la Producción Animal .....	17
1.2.6. Zeolita de Tipo Clinoptilolita en la Producción Animal.....	21
1.3. Hipótesis .....	24
1.4. Objetivo General.....	24
1.5. Objetivos Específicos .....	24
1.6. Sección Integradora .....	25
<b>2. INCLUSIÓN DIETARIA DE CLINOPTILOLITA COMO ADITIVO EN LA PRODUCCIÓN DE RUMIANTES</b> .....	28
<b>3. INFLUENCE OF FERULIC ACID AND CLINOPTILOLITE SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, CARCASS, MEAT QUALITY, AND FATTY ACID PROFILE OF FINISHED LAMBS</b> .....	39
<b>4. CLINOPTILOLITE AND FERULIC ACID EFFECTS ON <i>In vitro</i> RUMINAL FERMENTATION</b> .....	57
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	74
<b>6. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	82
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	83
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	84

## RESUMEN

Recientemente el sector pecuario se ha interesado por el uso de aditivos nutracéuticos debido a su potencial en la producción animal. Dentro de éstos, se encuentran los fitoquímicos como el ácido ferúlico (AF) o minerales como la clinoptilolita (CTL). Actualmente no existe reporte del uso combinado de estos compuestos a nivel productivo y metabólico en corderos. El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta de la suplementación de AF y CTL sobre el desempeño productivo, características de la canal, y calidad de la carne de ovinos de pelo en finalización (experimento 1), y la cinética de fermentación ruminal *in vitro* (FR) (experimento 2). El primer estudio consistió en una prueba de alimentación con 28 corderos Katahdin asignados en un arreglo factorial  $2^2$  de los tratamientos AF (0 o 300 ppm) y CTL (0 o 1%). La interacción AFxCTL no afectó los parámetros productivos y la calidad de la canal, excepto algunos ácidos grasos (AG) de la carne. De forma individual, AF redujo el consumo de alimento y conformación de la canal ( $P \leq 0.05$ ), mientras que CTL mejoró el color de la carne y aumentó el contenido de los ácidos caproico, miristoleico, pentadecanoico y el total de AG poliinsaturados ( $P \leq 0.05$ ). En el segundo experimento se realizó una prueba de FR *in vitro* utilizando los mismos aditivos bajo un arreglo factorial  $2^2$  con medidas repetidas en el tiempo (2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 h). Se observó un efecto de CTL y AFxCTL para mantener valores de pH más altos durante toda la fermentación. Las concentraciones de acetato y AG volátiles totales aumentaron debido a AF (~25 %), CTL (~23 %) y su interacción (~19 %) a las 48 h, mientras que a las 72 h las concentraciones solo aumentaron 21 y 15 % debido AF y CTL, respectivamente ( $P \leq 0.05$ ). Por otra parte, a las 48 h se registraron los valores más altos ( $P \leq 0.05$ ) de propionato para AF, CTL y su combinación, sin embargo, a las 72 h este aumento solamente se observó para factores principales. Además, AF aumentó ( $P \leq 0.05$ ) la producción total de gas durante todo el periodo experimental. Se concluye que la suplementación combinada de AF y CTL puede modular favorablemente la FR *in vitro*, aunque esto no se reflejó en el estudio *in vivo* para mejorar el desempeño productivo de los corderos. Por otra parte, CTL mejora el perfil lipídico y color de la carne de ovinos.

**Palabras claves:** Ovinos de pelo, fitoquímicos, zeolitas, rendimiento productivo, fermentación ruminal.

## ABSTRACT

Recently, there has been an interest in using nutraceuticals as feed additives in livestock due to their potential to improve meat production. As main alternatives, phytochemicals (such as ferulic acid; FA) or minerals (such as clinoptilolite; CTL) are included in this group. Nowadays, there is no report on the combined use of these compounds at a productive and metabolic level in lambs. The current study aimed to evaluate the effect of supplementation with FA and CTL combined on productive performance, carcass characteristics, and meat quality of finished hair-breed lambs (Exp. 1), and on *in vitro* rumen fermentation (exp. 2). Exp. 1 consisted of a feedlot performance trial, conducted to evaluate, under 2<sup>2</sup> factorial arrangements, the dietary effect of FA (0 or 300 ppm) and CTL (0 or 1%). Except for the fatty acid profile, there were no effects of FA x CTL interaction on growth performance, carcass characteristics, and meat quality. FA reduced feed intake and carcass conformation ( $P \leq 0.05$ ). Meanwhile, CTL modified the L\*, a\*, and C\* color parameters, and increased ( $P \leq 0.05$ ) the sum of PUFA, capric, myristoleic, and pentadecanoic acids. In Exp. 2, an *in vitro* rumen fermentation trial was carried out using same treatments combination of the Exp 1 (within 2<sup>2</sup> factorial arrangements with repeated measures: 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, and 72 h of fermentation). FA x CTL and CTL alone recorded the highest pH among treatments ( $P \leq 0.05$ ). Acetate and total VFA concentrations increased due to FA (~ 25 %), CTL (~ 23 %), and FA x CTL interaction (~ 19 %) inclusion at 48 h, while, at 72 h, the concentrations only increased about 21 and 15 % due to main factors ( $P \leq 0.05$ ). Propionate concentrations were higher ( $P \leq 0.05$ ) for the main factors and their combination at 48 h. However, this increase was only observed for FA and CTL at 72 h. Additionally, FA increased total gas production throughout experimental period ( $P \leq 0.05$ ). FA and CTL supplementation might modulate positively *in vitro* rumen fermentation characteristics. Despite *in vitro* findings, these benefits were not reflected in lambs' growth performance (exp. 1). Additionally, CTL supplementation improves the color and lipid profile in lamb meat.

**Keywords:** Hair-breed lambs, phytochemicals, zeolites, feedlot performance, rumen fermentation.

# 1. SINOPSIS

## 1.1. Justificación

La producción y consumo de carne ovina en México ha tenido un aumento considerable en los últimos años, sin embargo, el sector ovino se ha enfrentado a diversos desafíos que obstaculizan el crecimiento del hato nacional y consecuentemente la obtención de su carne (Vázquez-Martínez *et al.*, 2018; SIAP, 2021a). Entre los desafíos que enfrenta la ovinocultura en nuestro país están los relacionados a las condiciones socioeconómicas, ambientales y tecnológicas del país (Vázquez-Martínez *et al.*, 2018), motivos por el cual no se logra satisfacer la demanda nacional. Bajo este panorama, ha surgido la necesidad de buscar mercados extranjeros para la importación de este producto. En este contexto, con el fin de aumentar la producción de manera eficiente y sostenible, la industria ganadera ha buscado diferentes estrategias y herramientas tecnológicas orientadas a las mejoras en los sistemas de alimentación o a la manipulación genética (Martínez-González *et al.*, 2010). Dentro de estas estrategias, de manera cada vez más recurrente, los productores optan por emplear promotores de crecimiento como agonistas adrenérgicos- $\beta$  (AA- $\beta$ ) o implantes hormonales (Mendoza & Ricalde, 2016; González-Ronquillo & Hernández, 2017).

Los promotores de crecimiento se han empleado en la industria ganadera durante muchos años con el objetivo de incrementar el rendimiento de carne, aumentar las ganancias diarias de peso y mejorar la eficiencia alimenticia y características de la canal (Heitzman, 1979). Sin embargo, a pesar de los beneficios que han demostrado estos compuestos en la producción animal, las legislaciones vigentes de algunos países de la Unión Europea y Asia actúan como factor limitante para el uso de estos compuestos en animales destinados al consumo humano (González-Ronquillo & Hernández, 2017). Aunado a esto, recientemente ha incrementado el número de consumidores preocupados por alimentos generados bajo un enfoque de producción sustentable, ética y orgánica (Valadez-García *et al.*, 2021). Además, algunas investigaciones han reportado de manera específica que los promotores de crecimiento de tipo AA- $\beta$  pueden demeritar algunas características de calidad de la carne como la textura o el color (Dávila-Ramírez *et al.*, 2013; Cayetano-De-Jesús *et al.*, 2020).

De ahí que, en los últimos años se ha generado un interés en la búsqueda de nuevas alternativas de origen natural que tengan el potencial de sustituir a los promotores de crecimiento tradicionales, sin dejar de garantizar la seguridad alimentaria ni comprometer la salud humana o el bienestar animal (Lillehoj *et al.*, 2018). Dentro de las alternativas propuestas se encuentran los compuestos naturales con propiedades nutracéuticas, por ejemplo, extractos vegetales como los fitoquímicos o minerales como la zeolita.

Con respecto a los fitoquímicos, estos son componentes bioactivos provenientes de matrices vegetales, los cuales han demostrado influir tanto en el rendimiento y salud del ganado, como también en la calidad de su carne y derivados (Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2017; Peña-Torres *et al.*, 2019). Además, se ha documentado que son efectivos para reducir las emisiones de metano entérico proveniente de la producción de rumiantes (Hassan *et al.*, 2020). Debido a estos beneficios reportados, estos compuestos prometen ser una alternativa natural para sustituir a los promotores de crecimiento actualmente empleados. En este sentido, el ácido ferúlico (AF) es un fitoquímico que por los efectos biológicos que ejerce en el organismo, ha ido adquiriendo importancia dentro del sector pecuario, incluso, recientemente algunas investigaciones han reportado que tiene un efecto anabolizante en cerdos y bovinos (González-Ríos *et al.*, 2013; Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2021; Peña-Torres *et al.*, 2021). En estos mismos estudios se ha propuesto que debido a las semejanzas estructurales del AF con los compuestos AA- $\beta$ , éste podría interactuar con los receptores adrenérgicos y ejercer los mismos efectos biológicos en el metabolismo animal: promover el anabolismo mediante la redistribución de nutrientes y tejido adiposo hacia la síntesis de proteína muscular.

Sin embargo, estos efectos no han sido consistentes en ovinos suplementados con este fitoquímico, por lo que se propone que en esta especie el AF podría ocasionar cambios en la fermentación ruminal (FR) (Soberon *et al.*, 2012a; Macías-Cruz *et al.*, 2014; Valadez-García *et al.*, 2021; Nicolás-López *et al.*, 2022; Peña-Torres *et al.*, 2022). En este sentido, en la literatura se menciona que la suplementación de fitoquímicos en rumiantes puede aumentar el flujo de proteínas de sobrepaso al tracto gastrointestinal posterior, mejorar la producción de ácidos grasos volátiles y reducir la metanogénesis, lo cual contribuye a una mayor respuesta productiva de los animales (Demirtaş *et al.*, 2018; Kholif & Olafadehan, 2021). Por otro lado, algunos autores sugieren que los fitoquímicos actúan como depresores de la FR al inhibir el crecimiento de algunas bacterias ruminales o porque tienden a causar acidosis ruminal (Chesson *et al.*, 1982).

En este contexto, las zeolitas de tipo clinoptilolita (CTL) son aditivos alimenticios minerales que pueden utilizarse como amortiguadores para prevenir cualquier trastorno metabólico ruminal (Mumpton, 1998; Coombs *et al.*, 1998). Se ha observado en diversos estudios que la CTL además de regular el pH ruminal, mejora la relación acetato a propionato y la utilización del nitrógeno en el rumen, promoviendo un ambiente óptimo para que los microorganismos ruminales funcionen eficientemente (McCollum & Galyean, 1983; Goodarzi & Nanekarani, 2012; Urías-Estrada *et al.*, 2017; Roque-Jiménez *et al.*, 2018; Ghoneem *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022). Estos beneficios son atribuidos principalmente a sus propiedades de intercambio catiónico y tamizado molecular selectivo (Ming & Allen, 2001; Li *et al.*, 2017).

Con base en la información mencionada anteriormente, es posible que tanto el AF como la CTL modulen el proceso de FR hacia un mejor uso de la energía, por lo que el uso combinado de ambos compuestos representa una alternativa viable para mejorar el rendimiento productivo en rumiantes, además, las propiedades intrínsecas de la CTL podrían mitigar los potenciales efectos secundarios en el ambiente ruminal derivados de la adición de AF libre en la dieta. Hasta el momento hay pocos estudios donde se incluyan ambos aditivos en la dieta de rumiantes, asimismo, no se ha reportado en la literatura el efecto de la suplementación combinada de AF y CTL en las variables productivas y características de calidad de la carne de ovinos, así como su asociación a los cambios en los parámetros de FR. Además, el mecanismo de acción por el cual el AF actúa en ovinos no ha sido dilucidado por completo. Por ello, es necesario evaluar y comprobar si existe una sinergia que potencialice el efecto de ambos aditivos y que a su vez contribuya a una rentabilidad del sector ovino.

## 1.2. Antecedentes

### 1.2.1. Producción de Carne de Ovinos de Pelo en México

Recientemente, la ovinocultura en México ha tenido un crecimiento económico-social considerable dentro de las actividades pecuarias del país, que en comparación con la producción total de carne

de otras especies la de ovino contribuye tan solo con el 0.87 % de la producción total nacional, sin embargo se proyecta que esta cifra continúe incrementándose en los próximos años debido a las ventajas que representa la crianza de esta especie y a su adaptabilidad a las diferentes condiciones climáticas (SIAP, 2021a; Vicente et al., 2020).

Actualmente el hato ovino mexicano comprende de aproximadamente 8.8 millones de cabezas, donde más del 50 % tanto de su población como de su consumo se concentra en el centro y sur del país (SIAP, 2021b). Con respecto a la producción de carne de ovino, en el año 2021 se produjeron 65,845 toneladas de carne en canal provenientes principalmente del Estado de México (14.2 %), Hidalgo (10.4 %) y Veracruz (8.7 %) (SIAP, 2021c). A pesar de que la carne de cordero apenas alcanza un consumo nacional aproximado de 1 kg por habitante al año, hoy en día no se satisface la demanda nacional, teniendo que importar cerca del 30 % de la carne que se consume en el país (Vázquez-Martínez *et al.*, 2018). Adicionalmente, cabe mencionar que en la última década la producción ovina ha registrado un crecimiento anual del 20 % (SIAP, 2021a). Por lo tanto, bajo este panorama se potencializa la oportunidad de inversión de recursos económicos y de investigación con la finalidad de incentivar la producción de esta especie.

Actualmente, la ovinocultura en México se ha orientado principalmente a la producción de carne en agostaderos de zonas tropicales o semiáridas donde las razas de pelo han predominado debido a su alta adaptabilidad para desarrollarse y mantener su rendimiento productivo frente a condiciones climatológicas adversas y de baja disponibilidad de alimento, a diferencia de otras razas o especies productoras de carne (Quintanilla-Medina *et al.*, 2018; Vicente *et al.*, 2020). Esto resalta la importancia de las razas ovinas de pelo y su competencia para contribuir considerablemente a la demanda nacional de carne. Actualmente, la ovinocultura en el país se encuentra condicionada por factores que obstaculizan su producción, tales como las condiciones socioeconómicas, condiciones climatológicas, disponibilidad de insumos y la tecnología utilizada (Martínez-González *et al.*, 2010; Vázquez-Martínez *et al.*, 2018). Por lo que, debido a las limitaciones que han condicionado el desarrollo de la producción de esta especie, continuamente se buscan estrategias que favorezcan la eficiencia alimentaria y promuevan las ganancias diarias de peso y el rendimiento en canal, sin comprometer el bienestar animal ni la calidad de la carne. Algunas de estas estrategias son: la selección de razas, mejoras en los programas sanitarios y en los sistemas de alimentación (Martínez-González *et al.*, 2010). Con respecto a ésta última, recurrentemente se emplean distintas estrategias nutricionales para sostener la producción.

### 1.2.2. Estrategias Nutricionales Para la Producción de Carne de Ovinos de Pelo

Dentro de los sistemas de alimentación una de las herramientas que mayormente se implementan en la producción de carne es el uso de promotores de crecimiento (PC), los cuales pueden clasificarse como modificadores metabólicos tradicionales (AA- $\beta$  o implantes hormonales) o modificadores digestivos (Mendoza & Ricalde, 2016; González-Ronquillo & Hernández, 2017). Los promotores de crecimiento, han demostrado ser efectivos para aumentar la tasa de crecimiento, mejorar la conversión alimenticia y el rendimiento de la canal en diferentes especies. Cada PC tiene su propio mecanismo de acción y éste puede verse afectado por factores externos como la especie, el estado de homeostasis o salud del animal (Heitzman, 1979; Mendoza & Ricalde, 2016; González-Ronquillo & Hernández, 2017).

Con relación a los PC que se clasifican como modificadores metabólicos, estos actúan como agentes anabolizantes. De manera general, los agentes anabolizantes son mensajeros químicos intracelulares que desencadenan procesos biológicos en células diana al regular la actividad de algunas hormonas o proteínas (Heitzman, 1979; Fiems, 1987). Finalmente, esta cascada metabólica culmina por ejemplo en la expresión negativa de ciertos genes lipogénicos, la inhibición de receptores de cortisol, el aumento en la producción del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) o aumentando la secreción de la hormona de crecimiento; lo anterior en consecuencia promueve la síntesis de proteína en tejido muscular o la lipólisis en tejido adiposo, a la vez que disminuye el catabolismo proteico y la lipogénesis respectivamente en cada tejido (Heitzman, 1979; Fiems, 1987).

Por otra parte, los modificadores digestivos son compuestos que, al ser administrados en dosis adecuadas, pueden mejorar la digestibilidad de los alimentos y ocasionan cambios deseables en la microbiota intestinal o ruminal para el caso específico de los rumiantes (Soltan & Patra, 2021). Estos cambios en los microorganismos ruminales (MOR) pueden modular favorablemente los metabolitos finales de la FR hacia una mayor eficiencia en el uso de la energía proveniente de los alimentos y consecuentemente obtener un mayor rendimiento de carne o leche (Hassan *et al.*, 2020; Soltan & Patra, 2021; Kholif & Olafadehan, 2021).

### 1.2.3. Modulación de la Fermentación Ruminal

Los rumiantes son animales poligástricos que se caracterizan por tener cuatro estómagos: tres pre-estómagos (retículo, rumen y omaso) que en conjunto forman una cámara fermentativa pre-gástrica y un estómago glandular o verdadero, el abomaso (Hungate, 2013). Estos herbívoros a diferencia de los monogástricos pueden aprovechar la energía proveniente de los carbohidratos estructurales como la celulosa y hemicelulosa (Hobson & Stewart, 1988; Hungate, 2013). Y aunque los rumiantes *per se* no son capaces de producir las enzimas necesarias para degradar a la mayoría de los carbohidratos estructurales, han desarrollado en su cámara pre-gástrica una simbiosis con el consorcio de MOR que albergan principalmente en el rumen, proporcionando las condiciones adecuadas para que estos MOR se desarrollen y cumplan con esta función metabólica (Hungate, 2013).

En el rumen habita una diversa población de MOR, los cuales pueden clasificarse en diferentes grupos funcionales según el componente alimenticio que degraden (almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina, proteínas u otros ácidos) o según el producto final (formado por otros microorganismos) que metabolicen (Choudhury *et al.*, 2015). Esta comunidad de microorganismos se encuentra conformada por bacterias, arqueas metanogénicas, protozoarios y hongos anaerobios estrictos o facultativos, que coexisten e interactúan sinérgicamente entre sí para extraer la energía de los alimentos mediante la FR (Hungate, 2013; Choudhury *et al.*, 2015).

La FR es el proceso anaeróbico donde los MOR (principalmente las bacterias) convierten las macromoléculas del alimento en monómeros simples para cubrir sus necesidades nutricionales, y en cambio el rumiante dispone para cubrir sus requerimientos energéticos, de los metabolitos finales producidos por las bacterias ruminales durante la FR: ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena sencilla como acetato, propionato y butirato, también AGV de cadena ramificada como el isobutirato, isovalerato y valerato, y además los MOR representan una gran fuente de proteína de alto valor biológico una vez que llegan al intestino delgado (Hobson & Stewart, 1988). Estos productos son precursores de energía de los cuales el animal puede cubrir entre el 70 y 85 % de sus requerimientos diarios de energía y proteína respectivamente una vez que abandonan el rumen (Hobson & Stewart, 1988; Kristensen *et al.*, 1998). Los AGV son absorbidos por el epitelio ruminal y, posteriormente son transportados vía vena porta hacia los diferentes tejidos del mamífero para

ser metabolizados siguiendo las diferentes rutas metabólicas. Por otro lado, los MOR en conjunto con las proteínas de sobrepaso que escapan del rumen, son descompuestos en el intestino delgado por la acción de las enzimas endógenas del rumiante y dirigidos hacia los diferentes tejidos para las síntesis de proteína tisular (Kristensen *et al.*, 1998).

Sin embargo, la FR no es un proceso completamente eficiente en la producción de energía, debido a que durante este proceso también se generan moléculas de H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> (gases de efecto invernadero; GEI) y exceso de amoníaco, los cuales representan hasta un 12 % en pérdidas de energía. La producción de estos metabolitos intermediarios conduce al desaprovechamiento de átomos de carbono que podrían utilizarse para la formación de AGV o al gasto energético innecesario del reciclaje del nitrógeno vía ciclo de la urea (Kristensen *et al.*, 1998; Hassan *et al.*, 2020; Kholif & Olafadehan, 2021).

Por ello, con la finalidad de aprovechar al máximo la energía proveniente de los alimentos, durante años se ha buscado obtener un perfil deseable de la FR, en el cual se prioriza disminuir la relación de acetato a propionato, y aumentar tanto la producción de propionato (considerado como el único AGV capaz de formar glucosa) como el flujo de proteínas de sobrepaso al tracto posterior. Además, se busca disminuir las concentraciones de metano y nitrógeno amoniacal (Hassan *et al.*, 2020; Kholif & Olafadehan, 2021). Es así como, con el fin de optimizar el perfil de FR se requiere de una comprensión integral de los requisitos nutricionales específicos de cada animal, su etapa de producción y el rendimiento esperado.

#### **1.2.4. Estrategias Nutricionales Para Modular la Fermentación Ruminal**

Actualmente existen algunas estrategias nutricionales que se pueden implementar dentro de los sistemas de alimentación, con el objetivo de maximizar la eficiencia en el uso de los nutrientes y promover los procesos deseables de la FR. Dentro de estas estrategias se encuentran el cambiar la composición de la dieta, así como el uso de aditivos alimenticios (Mendoza & Ricalde, 2016; McGrath *et al.*, 2018).

Con respecto a la primera estrategia mencionada, la manipulación en la composición de la dieta representa un factor determinante en la estructura de la comunidad de microorganismos presente

en el rumen, además resulta ser el enfoque más practicado entre los productores. Dentro de las manipulaciones en la dieta, se pueden incluir los cambios físicos como el procesamiento y el tamaño de partícula del alimento o los cambios químicos como la calidad (composición nutricional) y proporciones del forraje o concentrado (Mendoza & Ricalde, 2016; McGrath *et al.*, 2018).

De acuerdo con los cambios que se realicen en la composición de la dieta, como resultado se favorecen ciertos grupos de bacterias, por ejemplo, en animales criados bajo sistemas de producción extensivos, donde son alimentados con dietas altas en fibra forrajera o forrajes maduros (altos niveles de carbohidratos estructurales), se ha observado una mayor prevalencia de bacterias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Ruminococcus* sp. (Van Houtert, 1993; De Brito *et al.*, 2017). Por otra parte, el perfil de bacterias ruminales es totalmente distinto en los animales alimentados bajo un sistema intensivo (dietas altas en concentrados), donde los grupos de bacterias aminolíticos y proteolíticos como *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium* y *Prevotella* sp. prevalecen (Van Houtert, 1993; Ellison *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018). Dentro de los beneficios encontrados en las dietas altas en concentrados o con ingredientes de alta calidad nutricional se ha observado: un aumento en el consumo y en la digestibilidad del alimento. Así mismo, debido al tipo de comunidades de bacterias que prevalecen en este tipo de dietas, los productos finales de la FR se inclinan hacia una alta producción de AGV totales, especialmente propionato, y una disminución en las concentraciones de metano y acetato (Muir *et al.*, 1998; Ellison *et al.*, 2017).

Sin embargo, debido a su rápida fermentación, una alta inclusión de granos en la dieta del rumiante puede provocar trastornos metabólicos que lleven a pérdidas económicas considerables, además, este tipo de dietas suelen elevar los costos de producción (Muir *et al.*, 1998; McGrath *et al.*, 2018). Es por esto que, según las posibilidades de cada productor, se opte por utilizar aditivos alimenticios que promuevan los cambios deseados en los productos finales de la FR o que actúen como agentes amortiguadores.

Diferentes aditivos alimenticios como ionóforos, antibióticos, agentes defaunantes, probióticos y prebióticos, han sido utilizados para modular mediante diferentes mecanismos de acción, la actividad de los microorganismos del rumen con el fin de favorecer el rendimiento de los rumiantes (Kholif & Olafadehan, 2021). Sin embargo, el efecto de algunos de estos compuestos disminuye con el tiempo o bien, pueden comprometer el bienestar animal, por lo que se ha limitado su uso. Por ello, basándose en las nuevas tendencias de producción y consumo, las investigaciones en

nutrición animal se han enfocado en el estudio y desarrollo de compuestos de origen natural con propiedades nutraceuticas: aceites esenciales, extractos puros (fitoquímicos), subproductos agroindustriales o minerales (zeolitas).

Recientemente estos productos naturales han generado interés científico debido a sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas, inmunoestimulantes e incluso promotoras del crecimiento (Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2017; Lillehoj *et al.*, 2018; Peña-Torres *et al.*, 2019). Algunos estudios en rumiantes han reportado efectos prometedores en la salud reproductiva, crecimiento y bienestar animal al incluir estos compuestos en dosis bajas o moderadas (Kholif & Olafadehan, 2021; Macías-Cruz *et al.*, 2018). Sus efectos son atribuidos a los componentes bioactivos presentes, los cuales sirven como defensa contra factores de estrés fisiológico o ambiental, y contra microorganismos patógenos. Además, debido a la transferencia de componentes antioxidantes al tejido animal o a su capacidad para estimular la actividad de las enzimas antioxidantes, se ha observado una mayor estabilidad oxidativa en la carne y leche proveniente de rumiantes alimentados con este tipo de compuestos (Clarke *et al.*, 2019; Biswas *et al.*, 2021).

No obstante, la consistencia en los efectos esperados dentro de la producción pecuaria por el uso de compuestos nutraceuticos aún es cuestionable, por lo cual, todavía se realizan investigaciones con el objetivo de encontrar tanto un aditivo de origen natural adecuado como su dosis, etapa de administración y periodo de tiempo efectivo.

### **1.2.5. Ácido Ferúlico en la Producción Animal**

Los fitoquímicos son metabolitos secundarios de las plantas los cuales no se involucran en los procesos bioquímicos primarios como el crecimiento, desarrollo y reproducción, sin embargo, intervienen en los mecanismos de defensa contra agentes patógenos o depredadores (Greathead, 2003). Anteriormente, estos compuestos biológicamente activos eran considerados como agentes anti nutricionales, debido a su capacidad para formar complejos principalmente con las proteínas e intervenir en la absorción de nutrientes (Bonerman *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2022). Sin embargo, recientemente el uso de fitoquímicos en la alimentación animal ha sido motivo de interés debido a

que, en dosis y tiempos de exposición adecuados, estos pueden ejercer efectos benéficos sobre el crecimiento, estado y salud reproductiva de los animales (Greathead, 2003; Windish *et al.*, 2006; Lillehoj *et al.*, 2018; Macías-Cruz *et al.*, 2018). Además, estos compuestos demuestran tener potencial para sustituir a los antibióticos y promotores de crecimiento tradicionales.

Dentro de este grupo de fitoquímicos se encuentran los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, cloregénico, p-cumárico, sináptico y cafeico), compuestos fenólicos con potente acción antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria, además de coadyuvar en el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes (Rahman *et al.*, 2006; Hooper *et al.*, 2008; Biasi *et al.*, 2011).

El AF es uno de los ácidos hidroxicinámicos más abundantes en las paredes celulares vegetales, especialmente de cereales, semillas, leguminosas, hortalizas y algunas frutas. Este compuesto se sintetiza a través de la ruta metabólica del ácido shikímico durante la biosíntesis de la lignina (Manach *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2022). Sus propiedades bioactivas son atribuidas a su estructura molecular: Su estructura central consiste en un anillo bencénico con un grupo hidroxilo (unido en la posición 4, brindándole su naturaleza fenólica) y un grupo metoxi (unido en la posición 3 del anillo). Además, cuenta con un grupo carboxilo en su cadena lateral y un doble enlace que de acuerdo con su configuración se determina su isomería cis-trans (Urbaniak *et al.*, 2013; Cavalcanti *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022). Estas características estructurales le confieren su potente acción antioxidante, permitiéndole donar fácilmente electrones de su grupo hidroxilo y reaccionar con otras especies reactivas al oxígeno sin propagar ni iniciar una reacción en cadena (Cavalcanti *et al.*, 2021). Diversos autores han reconocido la propiedad antimicrobiana del AF sobre bacterias patógenas, reportándose un mayor efecto contra las bacterias Gram-positivas (Jung & Fahey, 1983; Shi *et al.*, 2016). Este fenómeno se relaciona a la interacción de las moléculas de AF con la pared celular de los microorganismos, comprometiendo la integridad de la membrana y causando alteraciones morfológicas lo que conlleva a la lisis celular (Bonerman *et al.*, 1986; Shi *et al.*, 2016). En este sentido, el sector pecuario se ha interesado por el uso del AF en la suplementación animal debido a los potenciales beneficios que sus propiedades bioactivas podrían generar en el estado sanitario, productivo y reproductivo de los animales de granja (Macías-Cruz *et al.*, 2018).

Cabe señalar que en las matrices alimenticias el AF puede hallarse en muy pequeñas cantidades en su forma libre, mientras que, mayoritariamente se puede encontrar unido mediante enlaces éter y éster a la lignina y otros componentes de la pared celular como polisacáridos o algunas proteínas

(Wang *et al.*, 2022). Sin embargo, aunque el AF se encuentre intrínsecamente presente en los ingredientes que conforman la dieta animal, estos enlaces cruzados limitan su liberación y absorción para que este compuesto pueda ejercer sus efectos biológicos en el organismo (Manach *et al.*, 2004). De acuerdo con la información existente sobre la farmacocinética del AF, este compuesto debe ser hidrolizado por enzimas intestinales o liberado por la microbiota del colon para que pueda absorberse, llegar al sistema porta y acumularse en los tejidos diana para ejercer su actividad biológica (Manach *et al.*, 2004). No obstante, las concentraciones plasmáticas y la eficiencia de absorción del compuesto íntegro pueden verse reducidas por una inadecuada absorción en el intestino, o por ser altamente metabolizado y eliminado rápidamente vía biliar o urinaria (Chesson *et al.*, 1999; Manach *et al.*, 2004).

Por otra parte, con respecto a los rumiantes, el AF puede ser liberado a través de la degradación enzimática de los enlaces éster por medio de la acción de las feruloil esterases que producen algunas bacterias ruminales como *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, *S. bovis* o *Wolinella succinogenes*. Sin embargo, la liberación enzimática es dependiente del tiempo de permanencia del alimento en el rumen, además de la presencia y colonización de las bacterias ruminales de interés (Wang *et al.*, 2022). De manera adicional, es relevante mencionar que una vez liberado en el rumen, el AF es rápidamente absorbido. Algunos estudios donde se ha evaluado la cinética de la suplementación de AF aislado en rumiantes, se ha reportado que post ingesta se alcanzan concentraciones máximas en plasma, rumen y orina a los 15, 30 y 180 minutos respectivamente, permaneciendo entre 4 y 12 horas en circulación. En cambio, las concentraciones de AF en sangre y orina son casi indetectables cuando se ingiere intrínsecamente en la dieta (Soberon *et al.*, 2012a, Soberon *et al.*, 2012b, González-Plascencia, 2015). Por lo anterior, para garantizar la biodisponibilidad y efectividad del AF, se ha propuesto extraer este compuesto principalmente de subproductos agrícolas y administrarlo como un suplemento alimenticio aislado (Peña-Torres *et al.*, 2019; Valadez-García *et al.*, 2021).

Investigaciones recientes han estudiado el efecto de la suplementación dietaria de AF en los animales de engorda, reportando que el AF promueve una hipertrofia muscular y una mejor eficiencia alimenticia en diferentes especies (González-Rios *et al.*, 2013; Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2021; Peña-Torres *et al.*, 2022). De acuerdo con estos hallazgos, se ha sugerido que el AF puede comportarse como un promotor de crecimiento de tipo agonista adrenérgico  $\beta_2$  (AA- $\beta_2$ ) debido a la similitud estructural entre ambas moléculas. Esto favorece la afinidad del AF con los

receptores adrenérgicos  $\beta_2$  y, que consecuentemente, se generen efectos biológicos análogos a los compuestos AA- $\beta_2$  (Gorewit, 1983; Platt *et al.*, 2012; González-Rios *et al.*, 2013; Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2021).

Dentro de los estudios realizados en rumiantes, González-Rios *et al.*, (2013) observaron que la suplementación con 250 mg/d de AF en novillos producía rendimientos en canal y áreas de ojo de costilla (AOC) similares a los obtenidos por la suplementación con un promotor de crecimiento de tipo AA- $\beta_2$ . De igual manera, estos resultados coincidieron con lo reportado por Peña-Torres *et al.*, (2021), quienes además observaron mejores ganancias diarias de peso (GDP) y peso vivo final en los novillos suplementados con AF (250 y 500 mg/d). Sin embargo, existen inconsistencias en las investigaciones realizadas en ovinos, donde en algunos casos no se presentan los beneficios reportados por la suplementación con este compuesto fenólico (Soberon *et al.*, 2012a; Macías-Cruz *et al.*, 2014; Valadez-García *et al.*, 2021; Nicolás-López *et al.*, 2022; Peña-Torres *et al.*, 2022).

Estudios realizados por Macías-Cruz *et al.*, (2014) y Nicolás-López *et al.*, (2022) no encontraron cambios en los parámetros de comportamiento productivo ni calidad de la canal en corderas (Dorper x Pelibuey o Katahdin x Dorper) suplementadas con 300 y 250 mg/d de AF respectivamente. Por otra parte, en un estudio con corderos (Dorper x Pelibuey) que fueron suplementados con AF (300 y 600 mg/d) se observó un aumento en las GDP y peso vivo final con respecto a los corderos del tratamiento control (Peña-Torres *et al.*, 2022). Además, en este mismo estudio, los autores observaron que tanto la suplementación con AF como con Clorhidrato de Zilpaterol aumentaron de manera similar el área de sección transversal en fibras oxidativas del músculo *Longissimus Thoracis* y la expresión del gen que codifica para MHC-1. Con estos hallazgos, los autores refuerzan la hipótesis de que el AF puede actuar como promotor de crecimiento en corderos (Peña-Torres *et al.*, 2022). Sin embargo, Valadez-García *et al.*, (2021) solamente observaron estos efectos benéficos del AF sobre crecimiento cuando los animales presentaban un estado severo de estrés térmico, resultados que coinciden por lo reportado por Wang *et al.*, (2019). Con estos hallazgos los autores sugieren que la acción antioxidante del AF mejora el crecimiento de los ovinos cuando se encuentran en un estado oxidativo. Por lo descrito anteriormente, se requiere realizar más investigaciones sobre los efectos del AF en corderos de engorda bajo distintas condiciones, esto con la finalidad de confirmar el mecanismo por el cual el AF actúa y si éste se encuentra asociado a un segundo mecanismo de acción. Así mismo, la acción antimicrobiana del AF podría considerarse para ocasionar cambios favorables en la FR. Hasta la

fecha la información sobre los efectos del AF en las características de FR es limitada, por lo que se recomienda profundizar en el tema.

En relación con la calidad de la carne, los efectos de la suplementación con AF también han sido controversiales (González-Rios *et al.*, 2016; Peña *et al.*, 2018; Valadez-García *et al.*, 2021). En bovinos, González-Rios *et al.*, (2013) reportaron que los panelistas de su evaluación sensorial percibieron cortes más tiernos, jugosos y con mejor sabor en los animales suplementados con AF (250 mg/d). Este resultado se reforzó con la evaluación instrumental del esfuerzo al corte, donde la carne proveniente de novillos suplementados con AF, presentó valores de dureza más bajos (González-Rios *et al.*, 2013). En un segundo estudio los mismos autores reafirmaron lo encontrado, señalando que la suplementación con AF (300 mg/d) durante 30 d favorece la aceptación sensorial de la carne de novillos (González-Rios *et al.*, 2016). Por su parte, Peña-Torres *et al.*, (2021) no observaron diferencias en las características de color, esfuerzo al corte, pH, pérdida por cocción ni en la capacidad de retención de agua de la carne de novillos suplementados con este compuesto fenólico. Por otro lado, estos cambios en calidad de la carne debido al uso de AF, no han sido percibidos en la carne de ovinos suplementados (Peña *et al.*, 2018; Valadez-García *et al.*, 2021). Si bien, los resultados en cuanto a calidad de la carne han sido variables, la mayoría de los estudios han coincidido en indicar que la suplementación con AF aumenta tanto la vida útil de la carne al minimizar la oxidación de proteínas y lípidos, como el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, produciendo una carne más saludable para el consumo humano (González-Rios *et al.*, 2013, 2016).

#### **1.2.6. Zeolita de Tipo Clinoptilolita en la Producción Animal**

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos hidratados de estructura tridimensional constituidos primariamente por tetraedros de óxido de aluminio y silicio. Debido a la presencia de aluminio, las zeolitas presentan una estructura cargada negativamente, misma que es compensada por cationes alcalinos y alcalinotérreos positivos (potasio, calcio, magnesio, sodio, etc.), lo que genera un fuerte campo electrostático en la superficie interna para estabilizar la carga del mineral (Mumpton, 1998; Coombs *et al.*, 1998). Su característica estructura tridimensional (similar a la de un panal de abejas) le permite formar canales interconectados ocupados por moléculas de agua con libertad de

movimiento, además de iones intercambiables. Lo anterior hace que las zeolitas sean únicas con respecto a otros materiales, brindándole sus propiedades específicas: capacidad de adsorción selectiva, intercambio catiónico, tamizado molecular y deshidratación reversible (Ming & Allen, 2001; Li *et al.*, 2017). Aunque se han registrado más de 50 especies de zeolitas, cada una tiene su propia composición química y estructura, por lo tanto, cada una posee sus propias características fisicoquímicas únicas (Coombs *et al.*, 1998).

La zeolita de tipo clinoptilolita (CTL) es de gran interés dentro del sector pecuario para emplearse como aditivo alimenticio debido a que además de tener un comportamiento estable a altas temperaturas y pH, ha mostrado tener efectos benéficos en el rendimiento y salud animal (Valpotić *et al.*, 2017). Dentro de las propiedades específicas de la CTL ( $\text{Ca Na}_4 \text{K}_4 [\text{AlO}_2]_5 [\text{SiO}_2]_{30} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ), ésta tiene: una relación  $\text{Al/Si} \geq 4$ , tamaño de poro de 0.30 a 4 nm, capacidad de intercambio catiónico de 2.2 meq/100g y una afinidad pronunciada por elementos como el potasio, amonio, bario, sodio, calcio, hierro, magnesio, entre otros (Ames, 1960; Ming & Allen, 2001; Jha & Singh, 2016). Adicionalmente, la CTL es un material inerte, el cual no es absorbido ni degradado durante su transcurso por el tracto gastrointestinal, así, la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) la ha clasificado como un ingrediente seguro para utilizarse en dosis de hasta 10,000 mg/kg en la dieta animal (FEEDAP, 2013).

Con respecto a su uso en la alimentación de rumiantes, existen estudios donde se ha evaluado el efecto de la CTL en las características de la FR. La mayoría de estas investigaciones han coincidido que la adición de CTL (en dosis entre 1 y 2.5 %) estabiliza el pH ruminal, aumenta las concentraciones totales de AGV y propionato, también se ha visto una mejora en la relación acetato a propionato y en la digestibilidad de la materia orgánica (McCollum & Galyean, 1983; Goodarzi & Nanekarani, 2012; Urías-Estrada *et al.*, 2017; Roque-Jiménez *et al.*, 2018; Ghoneem *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022). Adicionalmente, algunos autores han reportado una disminución en las concentraciones de metano entérico (hasta el 49 % con respecto a un control) y nitrógeno amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) en los rumiantes suplementados con CTL (Kardaya *et al.*, 2012; El-Nile *et al.*, 2021). Estos cambios además de representar un beneficio para el medio ambiente podrían influir positivamente en el rendimiento productivo de los rumiantes haciendo más eficiente el proceso de FR. De hecho, diversas investigaciones realizadas en ovinos han reportado una mejor GDP y eficiencia alimenticia (Norouzian *et al.*, 2010; Roque-Jiménez *et al.*, 2018; Ghoneem *et al.*, 2022). Además, se han observados tendencias en el aumento del área del ojo de costilla (AOC) y

deposición de grasa (Forouzani *et al.*, 2004; Coronel-Burgos *et al.*, 2017; Estrada-Angulo *et al.*, 2017). Sin embargo, todavía existe inconsistencia entre estudios.

A la fecha, se han propuesto múltiples mecanismos por los cuales la CTL ejerce sus beneficios, los cuales se encuentran relacionados a su capacidad de intercambio catiónico. Por una parte, la CTL se comporta como un agente amortiguador en ambientes ácidos, donde puede intercambiar sus iones constituyentes por el excedente de iones de  $H^+$  permitiéndole neutralizar el pH ruminal. Asimismo, estos cambios en el ambiente ruminal proporcionarían las condiciones adecuadas para la actividad y desarrollo de algunas poblaciones de bacterias (White & Ohlrogge, 1983; Pond & Mumpton, 1984; Goodarzi & Nanekarani, 2012). De manera similar, la captura de los iones  $H^+$  podría permitir a la zeolita actuar como sumidero de  $H^+$  molecular, disminuyendo el sustrato para la reducción del dióxido de carbono a metano.

Por otro lado, la CTL tiene una alta afinidad por los iones de amonio, lo que le permite actuar como reservorio del exceso de amoníaco que se produce por la desaminación de las proteínas, mismo que más tarde puede ser liberado lentamente al intercambiar iones de calcio o sodio provenientes de la saliva que ingresa al rumen durante la rumia, contribuyendo así a una mejor asimilación del nitrógeno por los microorganismos ruminales (White & Ohlrogge, 1983; Mumpton, 1998).

Finalmente, se ha propuesto que la capacidad de intercambio catiónico puede influir en el metabolismo de algunas bacterias a través de la interacción de captura y liberación preferencial de cationes contenidos en la estructura del mineral, mismos que podrían interactuar con las membranas celulares de las bacterias (McCullum & Galyean, 1983). Estos cambios en la composición de las comunidades microbianas del rumen afectarían directamente a los productos finales de la FR. Hasta el momento, la información sobre el rendimiento productivo en rumiantes aún es limitada y con resultados contrastantes, por lo que se recomienda realizar más investigación al respecto con el fin de estandarizar las condiciones efectivas para el uso de la CTL en esta especie. Actualmente, en la literatura no se han encontrado estudios donde se evalúe el efecto de la suplementación con CTL en las características de calidad de la carne de rumiantes, no obstante, se han reportado mejoras en el perfil lipídico, estabilidad oxidativa y color de la carne de aves suplementados con CTL (Mallek *et al.*, 2012; Hcini *et al.*, 2018). Dada la propiedad de la zeolita para causar cambios en el ambiente ruminal y consecuentemente en las comunidades de microorganismos ruminales, el uso de la CTL en la dieta de rumiantes podría mejorar el perfil lipídico de su carne. Aunado, se ha indicado que la CTL cuenta con una capacidad antioxidante, la

cual está asociada a la captura de especies reactivas de oxígeno, metales de transición o a la estimulación de enzimas antioxidantes endógenas (Hcini *et al.*, 2018; Kraljević *et al.*, 2018). Lo discutido anteriormente, podría influir en la vida útil de la carne, favoreciendo las preferencias del consumidor. Nuevos estudios relacionados con el tema son necesarios para comprobar lo aquí planteado.

### 1.3. Hipótesis

La suplementación dietaria combinada con ácido ferúlico y zeolita en ovinos, modula la fermentación ruminal favorablemente, la cual se manifiesta en una mejora en el comportamiento productivo, calidad de la canal y la carne.

### 1.4. Objetivo General

Evaluar el efecto del uso combinado que tiene la zeolita tipo clinoptilolita y el ácido ferúlico, sobre el comportamiento productivo, fermentación ruminal, calidad de la canal y la carne de corderos de pelo en confinamiento.

### 1.5. Objetivos Específicos

1. Evaluar el comportamiento productivo de corderos en confinamiento suplementados con clinoptilolita y ácido ferúlico.
2. Evaluar la calidad de la canal y la carne de corderos suplementados con clinoptilolita y ácido ferúlico.
3. Evaluar la cinética de fermentación ruminal *in vitro* utilizando ácido ferúlico y clinoptilolita.

## 1.6. Sección Integradora

De manera general, el objetivo de este proyecto de investigación científica se enfocó en el estudio de los efectos relacionados con el uso individual y combinado de los aditivos alimenticios AF y CTL sobre el rendimiento productivo y la calidad de la carne de corderos de pelo en finalización. Además, se estudiaron los cambios que ocurren en los parámetros de fermentación ruminal con el fin de buscar elucidar el mecanismo de acción de ambos aditivos alimenticios. Para cumplir con lo propuesto, se plantearon tres objetivos específicos previamente mencionados, los cuales fueron cumplidos con éxito. Finalmente, como productos derivados de este trabajo de investigación se obtuvieron dos artículos originales y un artículo de revisión.

El primer artículo producido es un artículo de revisión titulado “Inclusión dietaria de clinoptilolita como aditivo en la producción de rumiantes”. Este artículo de revisión se encuentra publicado en la revista *Biotecnia* (2023, XXV: 1, DOI: 10.18633/biotecnia.v25i1.1759), la cual está indizada en índices de revistas CONAHCYT.

En este artículo se realizó una revisión literaria sobre el empleo de la clinoptilolita como aditivo alimenticio en la dieta de rumiantes y su influencia sobre los parámetros de fermentación ruminal y rendimiento productivo. A lo largo de esta revisión se analizaron las propiedades físicas y químicas de las zeolitas y se discutió sobre los efectos observados en la fermentación ruminal, comportamiento productivo y características de la canal de los rumiantes suplementados, además, se incluyeron los aspectos relacionados al uso seguro de este aditivo en la producción pecuaria.

En breve, en este artículo se resaltan tres puntos importantes: 1) La necesidad de migrar hacia sistemas de producción “verdes, limpios y éticos”, donde el uso de aditivos nutracéuticos como las zeolitas podría ser una alternativa viable. 2) Aun cuando se han reportado mejoras en el rendimiento, calidad de la carne y estado de salud de aves y cerdos cuando se incluye zeolita en su dieta, su uso en rumiantes no es una práctica rutinaria dentro de los sistemas productivos. Sin embargo, los resultados discutidos en esta revisión muestran el potencial que tienen las zeolitas (del tipo clinoptilolita) para mejorar deseablemente el perfil de fermentación ruminal y estado de salud de los rumiantes. 3) Se requiere ampliar el conocimiento sobre los efectos en la calidad de la carne de rumiantes suplementados con clinoptilolita, además de realizar más estudios enfocados a esclarecer las dosis y tiempo de administración efectivos para obtener resultados favorables en la producción de rumiantes.

El segundo manuscrito producido es un artículo de investigación titulado “Influence of ferulic acid and clinoptilolite supplementation on growth performance, carcass, meat quality, and fatty acid profile of finished lambs”. Este artículo se publicó en la revista Journal of Animal Science and Technology (2022, 64: 2, <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e21>, indizada en SCOPUS, JCR, entre otros, y factor de impacto de 2.32.

En este manuscrito se reportaron los resultados correspondientes a los dos primeros objetivos planteados en este proyecto de investigación. En esta etapa experimental se utilizaron veintiocho corderos de raza Katahdin en una prueba de alimentación intensiva para evaluar en un arreglo factorial 2x2 el efecto de la suplementación con ácido ferúlico (AF, 0 o 300 ppm) y clinoptilolita (CTL, 0 o 1 %) sobre el comportamiento productivo, calidad de canal y de la carne. En resumen, AF y CTL no interactuaron entre sí para mostrar un cambio en las variables estudiadas, con excepción de algunas modificaciones en el perfil lipídico de la carne. Por otra parte, el consumo de alimento y la conformación de la canal de los corderos suplementados de manera individual con AF se redujo. Con respecto a la suplementación con CTL, los resultados mostraron una tendencia en el aumento de consumo de alimento durante la prueba de alimentación. Así mismo, CTL mejoró los parámetros de color L\*, a\* y C\*. Con respecto al perfil de ácidos grasos de la carne, CTL aumentó los ácidos cáprico, miristoleico, pentadecanoico y el total de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que el ácido mirístico disminuyó debido a este compuesto. Finalmente, los ácidos grasos esteárico, linolelaídico y linolénico se modificaron por la interacción AF x CTL. En conclusión, aunque no se encontró un efecto interactivo entre ambos aditivos, la suplementación individual con CTL mejora algunos parámetros de color y perfil de ácidos grasos poliinsaturados en la carne ovina, mientras que AF muestra potencial para mejorar el consumo de alimento en corral.

El tercer producto de este trabajo corresponde a un segundo artículo de investigación que lleva por título “Clinoptilolite and ferulic acid effects on *in vitro* ruminal fermentation”. Este artículo se encuentra en preparación para enviarse a la revista Fermentation, perteneciente a la editorial de revistas MDPI, indizada en JCR, SCOPUS, entre otros y con factor de impacto de 3.7. Actualmente se encuentra en revisión interna.

Los resultados reportados en este artículo de investigación dan cumplimiento al tercer objetivo planteado en este trabajo de tesis. La finalidad de este segundo experimento fue evaluar los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* en respuesta a la adición de AF y CTL. Los

tratamientos fueron asignados bajo un arreglo factorial 2<sup>2</sup>: AF (0 y 300 ppm) y CTL (0 y 1%) con medidas repetidas en el tiempo (2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 y 72 h de fermentación). La interacción AF x CTL y CTL mantuvieron los niveles de pH ruminal más cercanos a la neutralidad durante todo el periodo de incubación. Por otra parte, AF y CTL disminuyeron las concentraciones de nitrógeno amoniacal a las 48 y 72 h. Además, a las 48 h de incubación la producción total de ácidos grasos volátiles (AGV), acetato y propionato aumentaron por efecto de los factores principales y su combinación, sin embargo, a las 72 h este aumento solo se mantuvo para los efectos principales. Las concentraciones de metano, butirato, isobutirato, isovalerato y la relación acetato: propionato no se vieron afectadas por ningún tratamiento. Adicionalmente, la producción total de gas fue aumentada por AF a través de todo el periodo experimental.

Los datos que fueron generados en esta segunda etapa experimental brindan conocimiento de frontera que ayudarán a esclarecer el mecanismo de acción y los efectos que tiene la suplementación con AF y CTL (sola y combinada) sobre los parámetros de fermentación ruminal en corderos de pelo.

## **2. INCLUSIÓN DIETARIA DE CLINOPTILOLITA COMO ADITIVO EN LA PRODUCCIÓN DE RUMIANTES**

Ana Tánori-Lozano<sup>a</sup>, Maricela Montalvo-Corral<sup>a</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>a</sup>, Martín Valenzuela-Melendres<sup>a</sup>, Libertad Zamorano-García<sup>a</sup>, José Luis Dávila-Ramírez<sup>b</sup> y Humberto González-Rios<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán # 46. Colonia La Victoria. Box 83304, Hermosillo Sonora, México.

<sup>b</sup>Ciencia Aplicada para el Desarrollo Tecnológico, A.C. (CIADETEC, A.C.) Pedro Moreno #24, Col. Centro Norte. Hermosillo, Sonora, México.

Publicado en línea el 25 de noviembre del 2022

Biotecnia / XXV (1): 51-60 (2023)

DOI: 10.18633/biotecnia.v25i1.1759



## Inclusión dietaria de clinoptilolita como aditivo en la producción de rumiantes

Dietary inclusion of clinoptilolite as a feed additive in ruminants production

Ana Tánori-Lozano<sup>a</sup>, Maricela Montalvo-Corral<sup>a</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>a</sup>, Martín Valenzuela-Melendres<sup>a</sup>, Zamorano-García Libertad<sup>a</sup>, José Luis Dávila-Ramírez<sup>b</sup>, Humberto González-Ríos<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas # 46. Colonia La Victoria. CP. 83304, Hermosillo Sonora, México.

<sup>b</sup> Ciencia Aplicada para el Desarrollo Tecnológico, A.C. (CIADETEC, A.C.), Pedro Moreno # 24, Col. Centro Norte. Hermosillo, Sonora, México.

### RESUMEN

En los últimos años, las investigaciones se han centrado en el estudio, desarrollo y validación de compuestos de origen natural que se puedan utilizar de manera eficaz y segura como alternativa a los promotores de crecimiento convencionales que se emplean rutinariamente en la producción pecuaria, de modo que estos no comprometan el bienestar animal, ni las características de calidad de la carne. Una de estas alternativas es el uso de minerales como las zeolitas de tipo clinoptilolita. La clinoptilolita al ser adicionada al alimento de rumiantes, ha demostrado tener efectos benéficos sobre algunos parámetros de la fermentación ruminal, lo cual se traduce en una mejora en el comportamiento productivo del animal. Los reportes sobre el uso en rumiantes son limitados y en algunos casos los resultados son inconsistentes. En esta revisión se discuten los efectos que se han encontrado en ovinos y bovinos al ser suplementados con distintas dosis de clinoptilolita.

**Palabras clave:** Rumiantes, Clinoptilolita, Comportamiento productivo, Fermentación ruminal.

### ABSTRACT

In recent years, research has focused on the study, development and validation of compounds of natural origin that can be used effectively and safely as an alternative to conventional growth promoters routinely used in livestock production, so that these do not compromise animal welfare, or the meat quality characteristics. One of these alternatives is the use of minerals such as zeolites of the clinoptilolite type. Clinoptilolite, when added to ruminant feed, has been shown to have beneficial effects on some parameters of ruminal fermentation, which translates into an improvement in the productive behavior of the animal. However, there is a lack of studies on ruminants, and in some cases have been inconclusive. Thus, the aim of this review is to discuss the effects of the dietary inclusion of clinoptilolite as a feed additive in ovinos, and bovinos supplemented with different levels of Clinoptilolite

**Key words:** Ruminants, Zeolites, Productive performance, Ruminal fermentation.

\*Autor para correspondencia: Humberto González-Ríos

Correo electrónico: hugory@ciad.mx

Recibido: 3 de junio de 2022

Aceptado: 21 de septiembre de 2022

### INTRODUCCIÓN

El cambio climático y la resistencia a antibióticos son dos de las principales amenazas a la salud animal y humana, y entre los diferentes factores que contribuyen a su impacto, la ganadería tiene una participación importante debido a la generación de gases de efecto invernadero (GEI) que se producen durante la fermentación ruminal (FR) (Gerber *et al.*, 2013). A su vez, la demanda de carne y leche proveniente de rumiantes aumenta de manera proporcional al incremento de la población humana (Baldi y Gottardo, 2017), por lo cual, la industria pecuaria además de aumentar la población de sus hatos ganaderos, ha buscado implementar diferentes estrategias que garanticen una eficiencia en la FR y en la utilización de alimento con el fin de obtener un mayor rendimiento de leche y carne. Dentro de estas estrategias se encuentra el uso de aditivos que modulen algunos parámetros de la FR, donde de manera recurrente los productores utilizan ionóforos o antibióticos promotores de crecimiento (APC) en dosis subterapéuticas con el objetivo de promover el crecimiento, mejorar la conversión alimenticia e incluso prevenir infecciones (Dibner y Richards, 2005). Su mecanismo de acción se encuentra relacionado con la inhibición en algunas poblaciones de microorganismos no deseados, lo cual promueve cambios en el microbioma ruminal (MOR) y consecuentemente en la dinámica de la FR. Estos cambios mejoran la utilización de nutrientes y uso de la energía (Dennis *et al.*, 1981; Gaskin *et al.*, 2002; Dibner y Richards, 2005). Sin embargo, existe la preocupación de que el uso imprudente de los APC conduzca al desarrollo de resistencias antimicrobianas y transferencia de genes resistentes a antibióticos a humanos, representando un peligro para la salud del consumidor (Castanon, 2007; Mathew *et al.*, 2007). Por ello se han propuesto otro tipo de aditivos alimenticios con propiedades nutraceuticas, capaces de sustituir a estos compuestos, manteniendo los beneficios reportados y garantizando una producción sustentable.

Dentro de este grupo de aditivos se encuentran los de uso común como ácidos orgánicos, enzimas digestivas, probióticos y prebióticos; además se encuentran aquellos aditivos alternativos como extractos vegetales y minerales como zeolitas de tipo clinoptilolita (Spears, 1996; Benchaar

*et al.*, 2008; Meschiatti *et al.*, 2019; Zayed *et al.*, 2020). Debido a su potencial en la producción animal, recientemente se ha incrementado el interés en el uso de estos aditivos alternativos. Sin embargo; las dosis, tipos de dietas o tiempos de exposición efectivos en rumiantes o monogástricos aún no se han dilucidado completamente, observándose en algunos casos efectos nulos o poco convenientes, aunado a que su uso prolongado podría conllevar a una adaptación metabólica, reduciendo el efecto esperado en el animal (Patra y Saxena, 2009; Peña-Torres *et al.*, 2019).

En el caso particular de la clinoptilolita (CTL), las dosis efectivas para monogástricos son conocidas y en la industria avícola es común incluirlas en la dieta de las aves de postura y pollos de engorda (Kyriakis *et al.*, 2002; FEEDAP, 2013; Hcini *et al.*, 2018). Por otra parte, aunque algunas investigaciones han reportado cambios favorables en los parámetros de la FR, la adición de CTL en la dieta de rumiantes no es una práctica rutinaria (McCullum y Galyean, 1983; Khachlouf *et al.*, 2018; Roque-Jiménez *et al.*, 2018). Esta revisión tiene como objetivo mostrar la información actual del uso de la CTL y su efecto en la producción de bovinos y ovinos.

#### **Definición y propiedades de las zeolitas tipo Clinoptilolita**

Las zeolitas son aluminosilicatos hidratados de estructura tridimensional constituidos por tetraedros de óxido de silicio y aluminio, los cuales se encuentran compensados con cationes intercambiables de potasio, calcio, magnesio y sodio; cuya función es estabilizar la carga de material (Mumpston, 1998; Coombs *et al.*, 1998). Su estructura les permite formar cavidades ocupadas por iones relativamente inocuos y moléculas de agua, las cuales muestran gran libertad de movimiento. Esto les brinda sus propiedades específicas: el intercambio catiónico, tamizado molecular, adsorción y la deshidratación reversible (Bish y Ming, 2001; Li *et al.*, 2017).

Las zeolitas se formaron a partir de la vitrificación de las cenizas volcánicas, es por ello que se encuentran catalogadas como minerales provenientes de rocas volcánicas, de los cuales se han registrado más de 50 especies (divididas en grupos) donde cada una tiene sus características fisicoquímicas únicas. En la industria pecuaria la zeolita de tipo CTL es la más empleada como aditivo alimenticio debido a que ha mostrado tener efectos benéficos en el rendimiento y salud animal, además, ha demostrado ser un aditivo inerte en el sistema digestivo, debido a que no reacciona químicamente con otros nutrientes o fluidos corporales, por lo que no causa efectos adversos a la salud (Coombs *et al.*, 1998; Valpotić *et al.*, 2017).

La CTL ( $\text{Ca Na}_4 \text{K}_4 [\text{AlO}_2]_5 [\text{SiO}_2]_{30} \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ) tiene una relación silicio/aluminio  $\geq 4$ , misma que la hace pertenecer al grupo de las zeolitas de tipo heulandita (Bish y Ming, 2001; Jha y Singh, 2016), es clasificada como un material microporoso (0.30 a 4 nm) con una capacidad de intercambio catiónico (CIC) de 2.2 meq/100g (Jha y Singh, 2016; Król, 2020) y una afinidad más pronunciada por algunos elementos:  $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Na}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+$  (Ames, 1960).

Dentro de los efectos estudiados que ha tenido la CTL, se encuentran la desintoxicación de organismos humanos y animales, efecto antibacterial, mejoras en la nutrición e inmunidad de los animales, dosificación de fármacos, separación de biomoléculas, purificación de agua, suelo y aire, absorbente de contaminantes radioactivos y descontaminación de aguas residuales descargadas de centro nucleares (Rostami y Jafari, 2014; Delkash *et al.*, 2015; Song *et al.*, 2015; Yuna, 2016; Valpotić *et al.*, 2017). Debido a sus propiedades presentadas en los animales de engorde, principalmente en aves y cerdos, recientemente se ha propuesto como alternativa para sustituir o complementar el efecto de los promotores de crecimiento tradicionales. El aprovechamiento de los nutrientes cuando se suplementa con este mineral, es atribuido principalmente a dos propiedades específicas, su CIC y su competencia como adsorbente. Estas propiedades posibilitan drenar moléculas no deseadas del organismo, regular la microbiota intestinal, permitiendo con ello un mayor tiempo de retención de los nutrientes, además de una liberación dosificada de los mismos en el tracto digestivo (Wu *et al.*, 2013; Tondar *et al.*, 2014; Valpotić *et al.*, 2016).

#### **Adsorción e intercambio catiónico de las Zeolitas**

La adsorción se describe como un proceso donde ocurren interacciones de tipo físicas, químicas o iónicas entre las moléculas de un adsorbente y adsorbato, las cuales influyen en la concentración de un compuesto o fluido (adsorbato) sobre la superficie de un sólido (adsorbente). La CIC de las zeolitas se considera dentro del proceso de adsorción, debido a que los iones del adsorbato solamente son reemplazados por los iones de compensación de la zeolita a través de interacciones electrostáticas que buscan neutralizar la carga (Kammerer *et al.*, 2019). Por lo tanto, se le conoce como CIC a la capacidad de sustitución o desplazamiento de los cationes de compensación de acuerdo con su radio iónico y concentración de carga. Esta capacidad se relaciona directamente con la cantidad de aluminio que contiene la zeolita; entre menor sea la relación silicio-aluminio, mayor será su CIC (Weltkamp y Puppe, 2013).

Últimamente, investigadores han centrado su interés en el estudio de las propiedades adsorbentes de la zeolita y otros materiales para la recuperación de diferentes compuestos, por una parte, para disminuir la carga orgánica de las aguas residuales y por otro lado para utilizarlos en el sector de la cosmética, farmacéutica y alimentaria, con el fin de enriquecer sus productos a una inversión relativamente económica al tratarse de un material de bajo costo (Ahmaruzzaman, 2008; Thiel *et al.*, 2013; Kammerer *et al.*, 2019). Además, se han realizado distintos trabajos con zeolitas para la dosificación controlada o retención de fármacos, aditivos o nutrientes en el organismo, de tal manera que estos sean mejor aprovechados. Por ejemplo, cuando son incluidos en la dieta de animales de producción, este aprovechamiento se ve reflejado en mejoras en el comportamiento productivo (Toprak *et al.*, 2016; Valpotić *et al.*, 2017). Otra propiedad de las zeolitas, es su capacidad para atrapar a las micotoxinas

encontradas en productos alimenticios para animales, lo cual disminuye el impacto que estas pudieran causar en la salud animal (Di Gregorio *et al.*, 2014).

Un estudio probó la capacidad de las zeolitas para prolongar el tiempo de liberación de un extracto fenólico, dentro de los resultados encontrados, se observó que, en el transcurso de 3 h, solamente se había liberado el 60 % del extracto de los hidrogeles que contenían 3 % de zeolita, este efecto se le atribuye a que la zeolita provocó una mayor reticulación en el material, además de un menor valor de liberación inicial (Cursaru *et al.*, 2020). Mientras tanto, en otro estudio donde se evaluaron las propiedades de desorción de la CTL (se utilizaron tres tamaños de partícula: pequeño, mediano y grande; 1.5-10  $\mu\text{m}$ , 5-16  $\mu\text{m}$  y 11-40  $\mu\text{m}$  respectivamente) modificada con aspirina bajo condiciones gástricas, se encontró que, a un pH de 2.0 y un tamaño de partícula grande (11-40  $\mu\text{m}$ ), la liberación de aspirina fue aproximadamente un 20 % menor que los otros tratamientos. Por otra parte, a un pH de 6.5 (intestinal) se alcanzó el 80 % de liberación de aspirina, lo cual indica que las propiedades de adsorción y desorción de la zeolita son dependientes del pH y tamaño de partícula (Tondar *et al.*, 2014). Con respecto a lo anterior, otros autores han observado que trabajar a un pH menor al pKa de la zeolita favorece la recuperación de moléculas, esto debido a la carga negativa de la zeolita y al principio de Coulomb; por lo que es importante mencionar que el punto de inflexión sobre la influencia del pH en la capacidad de adsorción de la zeolita se encuentra en un valor alrededor de 4.5 (Ahmaruzzaman, 2008; Dávila-Guzman *et al.*, 2012; Tondar *et al.*, 2014).

#### Modificación química de las Zeolitas

Con el fin de aprovechar y potencializar las propiedades de las zeolitas, éstas son sometidas a un proceso de modificación o activación de tal manera que este material se pueda emplear como adsorbente o dosificador de fármacos (Tondar *et al.*, 2014; Servatan *et al.*, 2020) o de distintas moléculas orgánicas (Martins *et al.*, 2020), también, mediante el uso de óxidos o iones metálicos como el zinc, cobre o plata, éstas potencializan su efecto bactericida o bacteriostático (Copcia *et al.*, 2011; Hagiware *et al.*, 2011; Ambrozova *et al.*, 2017; Milenkovic *et al.*, 2017; Fanta *et al.*, 2019), así mismo se han visto zeolitas impregnadas de urea que son utilizadas en la alimentación de rumiantes (Erwanto *et al.*, 2011; Kardaya *et al.*, 2012; Laza-Knoerr y Dumargue, 2020; Sallam *et al.*, 2022). Este principio se basa en la CIC de la zeolita, misma que le permite descationizar selectiva y parcialmente los cationes de compensación, para posteriormente cargar los cationes de interés según el grado de afinidad con el material (Ames, 1960; Sallam *et al.*, 2022). Por lo general para lograr esta modificación química, las zeolitas son sometidas a un proceso de elución llevado a cabo en soluciones acuosas a una concentración y temperatura conocida (Ceri *et al.*, 2002; Montes-Luna *et al.*, 2015).

La zeolita también puede ser modificada por medio de métodos físicos y mostrar efectos favorables, por ejemplo,

en un estudio donde se incorporó zeolita vibro activada y micronizada en la ración de vacas lecheras, la zeolita demostró reducir las incidencias de infecciones intramamarias de las vacas (Đuričić *et al.*, 2020). Por otra parte, El-Nile *et al.* (2021), estudiaron el efecto que tiene la nano-zeolita (zeolita reducida mecánicamente) sobre los parámetros de la FR en cabras. En este estudio se reportó una reducción en la producción de metano y una mejora en la producción total de ácidos grasos volátiles ruminales (AGV) y ácido propiónico en las cabras suplementadas.

#### Uso de la clinoptilolita natural en la industria pecuaria como estrategia de mejora en los parámetros productivos

La zeolita de tipo CTL es empleada en la nutrición animal principalmente por sus efectos sobre la salud de aves, cerdos y vacas lecheras, además es un ingrediente inerte que tiene efectos benéficos sobre la producción; para el caso específico de rumiantes como bovinos y ovinos, se ha observado que además de modular los parámetros de la FR, las zeolitas ocasionan cambios en algunas poblaciones de bacterias y protozoos del MOR (Galindo *et al.*, 1986; Goodarzi y Nanekarani, 2012), reflejándose en la producción de carne y leche.

#### Efectos en la fermentación ruminal

La CTL tiene una alta afinidad por los iones de amonio, se ha reportado una captura de hasta el 15% de éstos en el rumen, los cuales son liberados lentamente por un intercambio con los iones de sodio contenidos en la saliva que ingresa al rumen durante la rumia (Mumpton, 1998). Esto favorece la eficiencia en la síntesis de la proteína microbiana y reducción en las altas concentraciones de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), cuando en la alimentación del rumiante se agregan compuestos nitrogenados no proteicos (NNP) (White y Ohlrogge, 1983; Sallam *et al.*, 2022). Además, se han observado cambios en los parámetros de la FR al incorporar CTL natural o modificada en la dieta de rumiantes (Cuadro 1). Por ejemplo, se han visto mejoras en la relación acetato:propionato (A:P) durante la producción de AGV ruminales (McCollum y Galyean, 1983; Kardaya *et al.*, 2012), además de una reducción de hasta el 49 % en las concentraciones de gas metano (Kardaya *et al.*, 2012; El-Nile *et al.*, 2021).

A continuación, se presentan algunos ejemplos de diferentes estudios donde se evalúan los cambios en los parámetros de la FR y digestibilidad al suplementar a bovinos y ovinos con diferentes dosis de CTL. Por ejemplo, se tomó una muestra de líquido ruminal de ovinos suplementados con dos tipos de CTL y su combinación (cálcica y potásica), y se midió el pH,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , la concentración total de AGV y población de bacterias a diferentes horas post-alimentación (0, 3, 6 y 10). En este estudio se observó que la CTL cálcica mantuvo el pH ruminal cerca de la neutralidad a las 3, 6 y 10 horas, además, las concentraciones totales de AGV, y la población de bacterias celulolíticas fueron más altos en comparación con los demás tratamientos (Goodarzi y Nanekarani, 20112).

**Cuadro 1:** Cambios en los parámetros de la fermentación ruminal y digestibilidad de bovinos y ovinos suplementados con clinoptilolita  
**Table 1:** Effects of dietary clinoptilolite on rumen fermentation characteristics and digestibility in bovines, and ovines

Tiempo de exposición y dosis empleada	Especie (n)	Efecto observado	Referencia
CTL cálcica y potásica, 0 y 4 % por 3 sem	Ovinos n = 4	↑ pH, población de bacterias celulolíticas, producción total de AGV y absorción del NH <sub>3</sub> -N	Goodarzi & Nanekarani (2012)
Zeolita natural: 0, 20, 40 y 60 g/kg por 52 d	Ovinos Rambouillet n = 40	↑ Producción total de AGV, pH y retención de N	Roque-Jiménez <i>et al.</i> (2018)
CTL al 1.4 % por 12 sem	Vacas Holstein n = 30	T↑ pH ruminal T↓ Concentración total de AGV y ácido propiónico	Dschaak <i>et al.</i> (2010)
CTL-Ca: 0, 10, 20 y 30 g/kg por 35 d	Novillos Holstein n = 4	T↑ Concentración total de AGV, relación A:P ↑ Degradación de la materia orgánica, almidón y el flujo del NH <sub>3</sub> -N al duodeno	Urias-Estrada <i>et al.</i> (2017)
CTL potásica al 0, 1.5, 3 y 4.5 % por 17 d	Ovinos Pelibuey n = 4	↑ Concentración de ácido propiónico	Ruiz <i>et al.</i> (2007)
CTL al 0, 1.25, 2.5 y 5 % por periodos de 14 d	Novillos n = 4	↑ Concentración de ácido propiónico T↑ Concentración total de AGV, digestibilidad de nutrientes ↓ pH y nivel de NH <sub>3</sub> -N	McCollum & Galyean (1983)
CTL al 0, 3, 6 y 9 % por periodos de 17 d	Ovinos n = 8	Cambios en la digestibilidad de la materia seca, proteína y fibra ↑ pH	Ghaemia <i>et al.</i> (2010)
CTL 200 g/d por 12 sem	Vacas Holstein n = 16	↓ Concentración de ácido propiónico	Karatzia <i>et al.</i> (2011)
Zeolita natural al 2 % por 45 d	Ovinos Arabi n = 45	↑ pH y concentración de ácido acético	Mahdavi <i>et al.</i> (2021)
Zeolita al 0, 30 y 60 g/d por 90 d	Ovinos Mehraban n = 48	↑ Digestibilidad de la PC, MO y fibra.	Forouzani <i>et al.</i> (2004)
Zeolita natural 1 % y Zeolita impregnada con urea 2 % por 11 d	Ovinos n=24	↓ pH ruminal, concentración de ácido acético y metano Mejor relación acetato:propionato	Kardaya <i>et al.</i> (2012)
CTL cálcica 3 % por 120 d	Novillos Holstein n = 45	↑ Concentración de NH <sub>3</sub> -N (5.5 h post alimentación)	Sadeghi & Shawrang (2006)
CTL 1 y 2 % por 90 d	Ovinos Barki n = 30	↑ pH y digestibilidad de la PC, MO y fibra. ↓ Nivel de NH <sub>3</sub> -N (3 y 6 h post alimentación)	Ghoneem <i>et al.</i> (2022)

T: Tendencia; NH<sub>3</sub>-N: Nitrógeno amoniacal; AGV: Ácidos grasos volátiles; N: Nitrógeno; PC: Proteína cruda; MO: Materia orgánica

En otro trabajo donde se analizaron los parámetros de la FR, se observó un pH más alto en los corderos suplementados y una mayor producción de AGV al adicionar 40 y 60 g/kg de zeolita en el alimento (Roque-Jiménez *et al.*, 2018). Se puede observar que la mayoría de los estudios han reportado un pH ruminal alcalino en los animales suplementados con CTL (Dschaak *et al.*, 2010; Karatzia *et al.*, 2011; Mahdavi *et al.*, 2021). Sin embargo, en un estudio realizado en novillos donde se probaron 3 dosis diferentes de CTL (1.25, 2.5 y 5 %), se reportó un pH ligeramente ácido en los tratamientos donde se incluyó 2.5 y 5 % de CTL; no obstante, se reportó una mayor concentración de AGV totales y ácido propiónico (McCollum y Galyean, 1983). En este trabajo las concentraciones de AGV tendieron a incrementarse en los grupos experimentales (107.7, 106.6 y 106.8 mmol/L) con respecto al control (104.8) y se presentó un aumento significativo en la producción de ácido propiónico (38.1 vs 35.2%) para el grupo donde se incluyó 2.5 % de CTL en la dieta. El aumento en la producción de AGV y ácido propiónico ha sido constante en ovinos (Ruiz *et al.*, 2007; Goodarzi y Nanekarani, 2012; Roque-

Jiménez *et al.*, 2018; Sallam *et al.*, 2022) y novillos (McCollum y Galyean, 1983; Urias-Estrada *et al.*, 2017) cuando se utilizan dosis mayores al 1.5 % de CTL en la dieta. Por ejemplo, en ovinos de pelo, se reportó un incremento significativo en las concentraciones de propionato al adicionar 1.5 % de CTL en el alimento (Ruiz *et al.*, 2007). Con respecto a los efectos en la digestibilidad, se ha demostrado que la CTL mejora la digestibilidad de los nutrientes, por ejemplo, la inclusión de CTL en la dieta de ovinos redujo la digestibilidad de la materia seca, pero en cambio mejoró la digestibilidad de la proteína, materia orgánica y de la fibra en los ovinos (Forouzani *et al.*, 2004; Ghaemnia *et al.*, 2010; Ghoneem *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022) y novillos suplementados con diferentes dosis de CTL (Galindo *et al.*, 1982; McCollum y Galyean, 1983; Urias-Estrada *et al.*, 2017).

Por otra parte, la zeolita modificada también ha demostrado potencial para modular algunos parámetros de la FR, por ejemplo, Kardaya *et al.* (2012), estudiaron el efecto que tiene la zeolita impregnada con urea sobre las características de FR en ovinos. Los resultados mostraron que

tanto la zeolita como la zeolita modificada con urea pueden ser utilizadas para mejorar la relación A:P y reducir hasta en un 37% la producción de metano en el rumen, sin afectar la producción del resto de los AGV. Además, se observó que los tratamientos con zeolita mantuvieron las concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en rumen y las concentraciones de urea en plasma dentro de un rango normal-bajo. Estos cambios pueden ser atribuidos a la propiedad de adsorción-desorción de la zeolita, permitiéndole crear reservas de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en el rumen (Sadeghi y Shawrang, 2006; Kardaya *et al.*, 2012). En la mayoría de los sistemas de producción, el nitrógeno derivado de la degradación de las proteínas se produce por encima de la capacidad de los microorganismos ruminales para utilizarlo para su crecimiento, por lo que el exceso de  $\text{NH}_3\text{-N}$  se absorbe a través de las paredes ruminales e ingresa al ciclo de la urea en el hígado, para posteriormente reingresar al rumen por medio de la saliva o ser excretado en la orina. Esto incrementa la liberación de nitrógeno al medio ambiente y puede generar un aumento en los costos de producción.

El mecanismo de acción de este mineral se encuentra relacionado a las modulaciones que ocasiona en el ambiente ruminal: La zeolita ocasiona un efecto buferizante en el rumen (debido a su alta capacidad de intercambio de iones de  $\text{H}^+$ ), proporcionando condiciones favorables para el desarrollo y la actividad de las bacterias celulolíticas del rumen, además de una mejor eficiencia digestiva y producción de AGV (White y Ohlrogge, 1983; Pond y Mumpton, 1984; Goodarzi y Nanekarani, 2012). Además, las reservas de  $\text{NH}_3\text{-N}$  y su liberación controlada en el rumen debido a la CIC de la zeolita, permite una mayor utilización del nitrógeno de la dieta para la síntesis de proteína microbiana (White y Ohlrogge, 1983; Pond y Mumpton, 1984; Sadeghi y Shawrang, 2006; Erwanto *et al.*, 2011). Así mismo, en la mayoría de los estudios presentados anteriormente, se ha reportado un aumento en las concentraciones de propionato y en la reducción de la síntesis de metano. Estos cambios pueden estar relacionados a la CIC de la zeolita, permitiéndola actuar como sumidero de  $\text{H}^+$  molecular y ocasionando una disminución en su disponibilidad para la reducción de dióxido de carbono a metano por actividad de los metanógenos; otra posible explicación sugiere un efecto directo de la zeolita sobre la composición de las comunidades del MOR y sus productos finales.

Se ha reportado que un cambio en el patrón de producción en los AGV hacia una mayor producción de propionato es consecuencia de una mayor digestión ruminal del almidón o de un uso más eficiente de la energía, debido a que las bacterias ruminales utilizan más iones de  $\text{H}^+$  para la síntesis de propionato en lugar de acetato o metano (Boadi *et al.*, 2004; Urías-Estrada *et al.*, 2017). Los cambios en las concentraciones de propionato y metano podrían beneficiar tanto a la eficiencia de la producción ganadera como al medio ambiente. El metano que se forma durante la FR contribuye al 40 % de los gases de efecto invernadero que se generan en la producción de rumiantes, además, la producción de este gas representa para el rumiante hasta un 12 % de pérdida de la energía bruta del alimento (Beauchemin *et al.*, 2020).

### Efectos en el comportamiento productivo y características de la canal

A pesar de los potenciales efectos positivos sobre los parámetros de FR, el efecto de las zeolitas sobre el rendimiento en rumiantes no ha sido concluyente (Cuadro 2). Desde una perspectiva metabólica, las zeolitas no tienen un efecto directo sobre el rendimiento del ganado; sin embargo, al neutralizar el pH ruminal, proporcionan condiciones ruminales más favorables para un mejor desarrollo y actividad de las bacterias, y por consecuencia una mejora en la productividad animal. De acuerdo con esto, corderos (Deligiannis *et al.*, 2005; Norouzian *et al.*, 2010; Stojković *et al.*, 2012; Estrada-Angulo *et al.*, 2017; Abdelrahman *et al.*, 2021) de diferentes razas y novillos (Sherwood *et al.*, 2005) registraron mejores ganancias de peso y eficiencia alimenticia cuando fueron suplementados con CTL. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la suplementación con CTL no tiene efecto sobre el comportamiento productivo animal (McCullum y Galyean, 1983; Bosi *et al.*, 2002; Toprak *et al.*, 2016; Mahdavi *et al.*, 2021); no obstante, tampoco se ha reportado un efecto negativo sobre la producción, a excepción del estudio de Pond *et al.* (1984); En este trabajo se encontró una reducción en las ganancias de peso de los corderos suplementados con CTL y urea como fuente de NNP.

Por otro lado, los cambios en las características de la canal por efecto de la suplementación con CTL son limitados y además, los resultados encontrados hasta ahora son poco claros; algunos estudios reportan canales más magras y con una tendencia al aumento del área del ojo de costilla (Estrada-Angulo *et al.*, 2017; Coronel-Burgos *et al.*, 2017; Sallam *et al.*, 2022; Ghoneem *et al.*, 2022), mientras que otros autores no han observado efecto alguno en ninguna de las características de calidad de las canales (Pond *et al.*, 1984; Deligiannis *et al.*, 2005; Sherwood *et al.*, 2005) aun cuando los animales suplementados presentaron mejores ganancias de peso con respecto al grupo control. Una de las características de calidad de la canal de gran importancia económica es el rendimiento (relación entre el peso de la canal caliente y peso vivo del animal), y es bien conocido que se puede mejorar aumentando el nivel nutricional de la dieta (Alexandre *et al.*, 2009). En este sentido, la zeolita al ser un ingrediente que no tiene ningún aporte energético, disminuye la concentración de energía neta cuando es incluida en la dieta (Coronel-Burgos *et al.*, 2017; Estrada-Angulo *et al.*, 2017). Esta reducción de la densidad energética de la dieta puede reflejarse en una menor deposición de tejido muscular y grasa corporal en las canales de los animales suplementados, y por consecuencia en el rendimiento de éstas. Sin embargo, se requiere de más investigación para establecer si la CTL puede mejorar las características de las canales y además, aclarar las condiciones nutricionales de la dieta para una mejor utilización de la energía bajo una suplementación con este mineral.

Por otra parte, Khachlouf *et al.* (2018) recientemente realizaron un meta-análisis sobre los efectos en la producción y composición de la leche proveniente del ganado lechero suplementado con zeolita, principalmente CTL. El

**Cuadro 2:** Efectos en el comportamiento productivo y características de la canal de bovinos y ovinos suplementados con clinoptilolita.  
**Table 2:** Effects of dietary clinoptilolite on feedlot performance and carcass traits in bovines and ovines.

Tiempo de exposición y dosis empleada	Especie (n)	Efecto observado	Referencia
CTL al 0, 1.5 y 3 % por 6 sem	Ovinos Balouchi n = 30	↑ GDP	Norouzian et al. (2010)
Zeolita al 0, 30 y 60 g/d por 90 d	Ovinos Mehraban n = 48	↑ Consumo de alimento ↑ NS CA y AOC ↓ Menor deposición de grasa dorsal	Forouzani et al. (2004)
CTL al 0, 1.5, 3 y 4.5 % por 75 d	Ovinos Kathadin x Pellibuey n = 40	↑ Masa magra ↓ grasa tisular y visceral T↑ AOC	Coronel-Burgos et al. (2017)
CTL 1 y 2 % por 90 d	Ovinos Barki n = 30	T↑ GDP y T↓ CA	Ghoneem et al. (2022)
Zeolita natural: 0, 20, 40 y 60 g/kg por 52 d	Ovinos Rambouillet n = 40	↑ GDP y CA	Roque-Jiménez et al. (2018)
CTL: 0 y 3% por 3 meses	Ovinos Karagouniko n = 24	↑ GDP y consumo de alimento Características de la canal sin cambio	Deligiannis et al. (2005)
CTL al 0, 1.5, 3 y 4.5 % por 75 d	Ovinos Kathadin x Pellibuey n = 40	↑ CA Sin cambio en consumo de alimento	Estrada-Angulo et al. (2017)
CTL al 1.2 % por 168 d	Bovinos n = 96	↑ NS GDP (3.4 %) y CA (2.8 %)	Sherwood et al. (2005)
CTL al 0, 1, 2 y 3 % por 56 d	Ovinos Kathadin x Pellibuey n = 40	Sin cambios en el comportamiento productivo ↓ Menor deposición de grasa dorsal	Estrada-Angulo et al. (2017)
CTL al 1 y 2 % por 56 d	Ovinos Naemi n = 24	↑ Ganancia total de peso y consumo de alimento	Abdelrahman et al. (2021)
Alimento a base de CTL	Ovinos n = 15	↑ Ganancia total de peso, GDP y CA ↓ Incidencia de diarreas	Stojkovic et al. (2012)
Aluminosilicato de sodio: 0 y 200 g/d por 100 d	Vacas Holstein n = 42	↑ Producción de leche (+2.18 kg/vaca) Sin cambios en la composición química de la leche	Khachlouf et al. (2019)
CTL al 0, 150 y 300 g/d por 20 sem	Vacas Holstein n = 90	Sin cambios en la producción de leche	Marin et al. (2020)

T: Tendencia; GDP: Ganancia diaria de peso; NS: Resultado no significativo AOC: Área del ojo de costilla; CA: Conversión alimenticia

meta-análisis reveló un aumento en la producción de leche cuando las vacas son suplementadas con dosis entre los 200 y 300 g/d. Una mejora en el rendimiento de la leche puede ser resultado de una modificación en algunos de los parámetros de la FR como: un aumento en la producción de propionato, mejoras en la digestibilidad o una mayor síntesis de proteína microbiana (Marin et al., 2020). No obstante, algunos autores no reportaron cambios en la producción de leche (Bosi et al., 2002; Dschaak et al., 2010; Khachlouf et al., 2019); estas inconsistencias pueden estar relacionados a la dosis utilizada, la composición de la dieta o de la zeolita, consumo de alimento o el tamaño de partícula del alimento (Khachlouf et al., 2018; Marin et al., 2020).

Es importante resaltar que con respecto a la influencia en la calidad de la carne de rumiantes por la suplementación con CTL, hasta nuestra revisión se cuenta con muy poca información disponible en la literatura. No obstante, los resultados de un estudio reportan una mejora en el color de la carne de corderos suplementados con 1 % de CTL, principalmente en los parámetros L\*, a\* y C\*, además se observó una mejora en el perfil lipídico e índices nutricionales de la carne de los corderos suplementados (Tánori-Lozano et al., 2022). Este último resultado, coincide con los cambios reportados en el perfil lipídico de la carne de aves suplementadas con CTL (Mallek et al., 2012; Hcini et al., 2018).

### Seguridad de la Clinoptilolita

Con respecto al uso de CTL, hasta el momento no se han reportado efectos tóxicos a su exposición durante periodos largos, incluso algunos estudios han encontrado resultados prometedores sobre la inhibición del desarrollo de células cancerígenas (Pavelić et al., 2018; Eisenwagen y Pavelić, 2020). Recientemente se ha discutido la posibilidad de que ocurra una desorción de los metales pesados atrapados en las zeolitas cuando esta transita por el intestino; sin embargo, debido a la alta afinidad que tiene la CTL por los metales pesados, la adsorción es casi irreversible (Hamidpour et al., 2010; Tondar et al., 2014).

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aprobó el uso de CTL como un aditivo seguro para utilizarse en la industria pecuaria a dosis de hasta 10,000 mg/kg. La CTL al ser un aditivo inerte, no se absorbe ni se degrada durante su paso por el tracto digestivo, por lo que es completamente excretada en las heces (FEEDAP, 2013). En ninguno de los estudios anteriores se reportaron efectos negativos sobre la productividad o salud de los animales que fueron suplementados con CTL. Por el contrario, la adición del mineral a la dieta contribuyó a su salud, disminuyendo el índice de diarreas o infecciones intramamarias (Deligiannis et al., 2005; Norouzian et al., 2010; Stojković et al., 2012; Khachlouf et al., 2019; Đuričić et al., 2020), así como las concentraciones

de aflatoxinas (Katsoulos *et al.*, 2016) y de metales pesados (Khachlouf *et al.*, 2019) en la leche de vacas. Otra de las preocupaciones sobre el uso de zeolitas en la nutrición animal, es su potencial efecto de adsorber minerales o vitaminas esenciales, lo que a largo plazo pudiera provocar desbalances nutricionales y repercutir negativamente en la productividad animal. No obstante, varios estudios han mostrado que la suplementación con CTL no tuvo efectos adversos sobre las concentraciones séricas de Cu, Fe, Zn, Na, K, Ca, Mg y vitaminas A y E (Bosi *et al.*, 2002; Papaloannou *et al.*, 2002; Katsoulos *et al.*, 2005; Khachlouf *et al.*, 2019). Incluso, Khachlouf *et al.* (2019) reportaron un incremento en las concentraciones de Ca sanguíneo en las vacas suplementadas con 200 g/d de CTL en su etapa pre-parto y lactancia; este resultado sugiere que la inclusión de CTL en la dieta de las vacas podría reducir la incidencia de hipocalcemia post-parto.

### Conclusiones y perspectivas futuras

La continua preocupación por el riesgo a la salud humana y animal que representa el uso indiscriminado de los APC, aunado al necesario traslado hacia un sistema de producción sustentable con menor impacto ambiental, requiere la búsqueda de ingredientes con valor nutricional y/o propiedades bioactivas que compitan con los promotores de crecimiento tradicionales. Sin embargo, hoy en día existen muchas preguntas e incertidumbre sobre el uso de estos ingredientes alternativos para implementarse rutinariamente en la producción animal, principalmente debido al desconocimiento sobre los beneficios que éstos compuestos pueden tener tanto en el aspecto económico, como productivo y ambiental. Por otro lado, el uso de productos de origen natural tiene poca aceptación por parte de los productores a causa de que los efectos de algunos de estos compuestos son moderados e incluso en algunos casos inconsistentes. Hasta el momento, según la información actual, el uso de CTL en la dieta de rumiantes pudiera ser una estrategia prometedora para la obtención de mejores resultados en la producción y calidad de carne y leche proveniente de rumiantes.

Los resultados presentados en esta revisión muestran el potencial que tiene la CTL en la producción animal, por lo cual se requiere realizar más investigaciones sobre el uso de este aditivo, con la finalidad de establecer las condiciones de dosificación, composición de la dieta y de la zeolita, así como el tamaño de partícula del mineral. Además, se requieren nuevos estudios sobre los efectos en la calidad de la carne de los rumiantes.

### REFERENCIAS

- Abdelrahman, M.M., Alhidary, I., Adeniji, Y.A., Alobre, M.M., Albaadani, H., y Aljumaah, R. 2021. Manipulating Phosphorus, Calcium, and Magnesium Utilization by Growing Lambs Using Natural Zeolite (Clinoptilolite). *Sustainability* 13:1539.
- Ahmaruzzaman, M. 2008. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: a review. *Advances in colloid and interface science* 143:48-67.
- Alexandre, G., Limea, L., Fanchonne, A., Copry, O., Mandonnet, N., y Boval, M. 2009. Effect of forage feeding on goat meat production: carcass characteristics and composition of Creole kids reared either at pasture or indoors in the humid tropics. *Asian-Australasian journal of animal sciences* 22:1140-50.
- Ambrozova, P., Kynicky, J., Urubek, T., y Nguyen, V.D. 2017. Synthesis and modification of clinoptilolite. *Molecules* 22:1107.
- Ames Jr, L. 1960. The cation sieve properties of clinoptilolite. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials* 45:689-700.
- Baldi, A., y Gottardo, D. 2017. Livestock Production to Feed the Planet: Animal Protein: A Forecast of Global Demand over the Next Years. *Rel: Beyond Anthropocentrism* 5:65.
- Beauchemin, K.A., Ungerfeld, E.M., Eckard, R.J., y Wang, M. 2020. Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons learned and future challenges for mitigation. *Animal* 14:s2-s16.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G., Colombatto, D., McAllister, T.A., y Beauchemin, K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145:209-28.
- Bish, D.L., y Ming, D.W. 2001. Natural zeolites: Occurrence, properties, applications, vol. 45. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, Mineralogical Society of America, Chantilly, Virginia.
- Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J., y Massé, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science* 84:319-35.
- Bosi, P., Creston, D., y Casini, L. 2002. Production performance of dairy cows after the dietary addition of clinoptilolite. *Italian Journal of Animal Science* 1:187-95.
- Castanon, J. 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry science* 86:2466-71.
- Cerri, G., Langella, A., Pansini, M., y Cappelletti, P. 2002. Methods of determining cation exchange capacities for clinoptilolite-rich rocks of the Logudoro region in northern Sardinia, Italy. *Clays and Clay Minerals* 50:127-35.
- Coombs, D.S., Alberti, A., Armbruster, T., Artioli, G., Colella, C., Galli, E., Grice, J.D., Liebau, F., Mandarino, J.A., et al. 1998. Recommended nomenclature for zeolite minerals: report of the subcommittee on zeolites of the International Mineralogical Association, Commission on New Minerals and Mineral Names. *Mineralogical Magazine* 62:533-71.
- Copcia, V.E., Luchian, C., Dunca, S., Bilba, N., y Hristodor, C.M. 2011. Antibacterial activity of silver-modified natural clinoptilolite. *Journal of materials science* 46:7121-28.
- Coronel-Burgos, F., Plascencia, A., Castro-Pérez, B., Contreras-Pérez, G., Barreras, A., y Estrada-Angulo, A. 2017. Influencia de la sustitución parcial del maíz y de la pasta de soja por zeolita en ovinos en etapa de finalización: Características de la canal, composición tisular y masa visceral. *Archivos de zootecnia* 66:223-28.
- Cursaru, B., Radu, A.-L., Perrin, F.-X., Sarbu, A., Teodorescu, M., Gavrilă, A.-M., Damian, C.-M., Sandu, T., Iordache, T.-V., et al. 2020. Poly (ethylene glycol) Composite Hydrogels with Natural Zeolite as Filler for Controlled Delivery Applications. *Macromolecular Research* 28:211-20.

- Dávila-Guzman, N.E., Cerino-Córdova, F.J., Díaz-Flores, P.E., Rangel-Mendez, J.R., Sánchez-González, M.N., y Soto-Regalado, E. 2012. Equilibrium and kinetic studies of ferulic acid adsorption by Amberlite XAD-16. *Chemical Engineering Journal* 183:112-16.
- Deligiannis, K., Lainas, T., Arsenos, G., Papadopoulos, E., Fortomaris, P., Kufidis, D., Stamatari, C., y Zygoyiannis, D. 2005. The effect of feeding clinoptilolite on food intake and performance of growing lambs infected or not with gastrointestinal nematodes. *Livestock Production Science* 96:195-203.
- Delkash, M., Bakhshayesh, B.E., y Kazemian, H. 2015. Using zeolitic adsorbents to cleanup special wastewater streams: A review. *Microporous and Mesoporous Materials* 214:224-41.
- Dennis, S., Nagaraja, T., y Bartley, E. 1981. Effect of lasalocid or monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. *Journal of Animal Science* 52:418-26.
- Di Gregorio, M.C., Neeff, D.V.d., Jager, A.V., Corassin, C.H., Carão, Á.C.d.P., Albuquerque, R.d., Azevedo, A.C.d., y Oliveira, C.A.F. 2014. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. *Toxin Reviews* 33:125-35.
- Dibner, J.J., y Richards, J.D. 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science* 84:634-43.
- Dschaak, C., Eun, J.-S., Young, A., Stott, R., y Peterson, S. 2010. Effects of supplementation of natural zeolite on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactational performance of dairy cows. *The Professional Animal Scientist* 26:647-54.
- Đuričić, D., Sukalić, T., Marković, F., Kočila, P., Žura Žaja, I., Menčić, S., Dobranić, T., Benić, M., y Samardžija, M. 2020. Effects of dietary vibroactivated clinoptilolite supplementation on the intramammary microbiological findings in dairy cows. *Animals* 10:202.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), 2013. Scientific Opinion on the safety and efficacy of clinoptilolite of sedimentary origin for all animal species. *EFSA Journal* 11:30-39.
- Eisenwagen, S., y Pavlič, K. 2020. Potential Role of Zeolites in Rehabilitation of Cancer Patients. *Archives of Physiotherapy and Rehabilitation* 3:29-40.
- El-Nile, A., Elazab, M., El-Zaiat, H., El-Azrak, K.E.-D., Elkomy, A., Sallam, S., y Soltan, Y. 2021. In vitro and in vivo assessment of dietary supplementation of both natural or nano-zeolite in goat diets: Effects on ruminal fermentation and nutrients digestibility. *Animals* 11:2215.
- Erwanto, E., Zakaria, W.A., y Prayuwidayati, M. 2011. The use of ammoniated zeolite to improve rumen metabolism in ruminant. *Animal Production* 13.
- Estrada-Angulo, A., Burgos, F.C., Pérez, B.C., Soto, M.L., Barreras, A., Montoya, C.A., Pérez, G.C., y Plascencia, A. 2017. Efecto de la inclusión de zeolita (clinoptilolita) en ovinos en etapa de finalización: Respuesta productiva y energética de la dieta. *Archivos de zootecnia* 66:381-86.
- Estrada-Angulo, A., Urias-Estrada, J.D., Castro-Pérez, B.J., Contreras-Pérez, G., Angulo-Montoya, C., Barreras, A., López-Soto, M.A., Olivas-Valdez, J.A., y Plascencia, A. 2017. Impact of dietary inclusion of clinoptilolite as substitute of soybean meal on growth performance, dietary energetics and carcass traits of feedlot ewes fed a corn-based diet. *Austral journal of veterinary sciences* 49:123-28.
- Fanta, F.T., Dubale, A.A., Bebizuh, D.F., y Atlabachew, M. 2019. Copper doped zeolite composite for antimicrobial activity and heavy metal removal from waste water. *BMC chemistry* 13:1-12.
- Forouzani, R., Rowghani, E., y Zamiri, M.J. 2004. The effect of zeolite on digestibility and feedlot performance of Mehraban male lambs given a diet containing urea-treated maize silage. *Animal Science* 78:179-84.
- Galindo, J., Elias, A., y Cordero, J. 1982. The addition of zeolite to silage diets. 1. Effect of the zeolite level on the rumen cellulolysis of cows fed silage. *Cuban Journal of Agricultural Science* 16:277-84.
- Galindo, J., Elias, A., y Gonzalez, M. 1986. The effect of zeolite on ruminal bacteria population and its activity in heifers fed sunflower: sorghum silage. *Studies in Surface Science and Catalysis*. Elsevier, pp. 1055-59.
- Gaskins, H., Collier, C., y Anderson, D. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology* 13:29-42.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A., y Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Ghaemnia, L., Bojarpour, M., Mirzadeh, K.H., Chaji, M., y Eslami, M. 2010. Effects of Different Levels of Zeolite on Digestibility. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9:779-81.
- Ghoneem, W.M., El-Tanany, R.R., y Mahmoud, A.E. 2022. Effect of Natural Zeolite as a Rumen Buffer on Growth Performance and Nitrogen Utilization of Barki Lambs. *Pakistan J. Zool* 54:1199-207.
- Goodarzi, M., y Nanekarani, S. 2012. The effects of calcic and potassic clinoptilolite on ruminal parameters in Lori breed sheep. *APCBEE Procedia* 4:140-45.
- Hagiwara, Z., Hoshino, S., Ishino, H., Nohara, S., Tagawa, K., y Yamanaka, K. 2011. United States Patent No 4 911 898. Retrieved on January.
- Hamidpour, M., Kalbasi, M., Afyuni, M., Shariatmadari, H., Holm, P.E., y Hansen, H.C.B. 2010. Sorption hysteresis of Cd (II) and Pb (II) on natural zeolite and bentonite. *Journal of hazardous materials* 181:686-91.
- Hcini, E., Ben Slima, A., Kallel, I., Zormati, S., Traore, A.I., y Gdoura, R. 2018. Does supplemental zeolite (clinoptilolite) affect growth performance, meat texture, oxidative stress and production of polyunsaturated fatty acid of Turkey poults? *Lipids in health and disease* 17:1-9.
- Jha, B., y Singh, D.N. 2016. Fly ash zeolites. *Advanced Structured Materials* 78:5-31.
- Kammerer, D.R., Kammerer, J., y Carle, R. 2019. Adsorption and Ion Exchange for the Recovery and Fractionation of Polyphenols: Principles and Applications, Polyphenols in Plants. Elsevier, pp. 327-39.
- Karatzia, M.A., Pourliotis, K., Katsoulos, P.D., y Karatzias, H. 2011. Effects of in-feed inclusion of clinoptilolite on blood serum concentrations of aluminium and inorganic phosphorus and on ruminal pH and volatile fatty acid concentrations in dairy cows. *Biological trace element research* 142:159-66.
- Kardaya, D., Sudrajat, D., y Dihansih, E. 2012. Efficacy of dietary urea-impregnated zeolite in improving rumen fermentation characteristics of local lamb. *Media Peternakan* 35:207-07.

- Katsoulos, P.D., Karatzia, M.A., Boscós, C., Wolf, P., y Karatzias, H. 2016. In-field evaluation of clinoptilolite feeding efficacy on the reduction of milk aflatoxin M1 concentration in dairy cattle. *Journal of animal science and technology* 58:1-7.
- Katsoulos, P.-D., Roubies, N., Panousis, N., y Karatzias, H. 2005. Effects of long-term feeding dairy cows on a diet supplemented with clinoptilolite on certain serum trace elements. *Biological trace element research* 108:137-45.
- Khachlouf, K., Hamed, H., Gdoura, R., y Gargouri, A. 2018. Effects of zeolite supplementation on dairy cow production and ruminal parameters—a review. *Annals of Animal Science* 18:857-77
- Khachlouf, K., Hamed, H., Gdoura, R., y Gargouri, A. 2019. Effects of dietary Zeolite supplementation on milk yield and composition and blood minerals status in lactating dairy cows. *Journal of Applied Animal Research*.
- Kraljević Pavelić, S., Simović Medica, J., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., y Pavelić, K. 2018. Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications in vivo. *Frontiers in pharmacology*:1350.
- Król, M. 2020. Natural vs. synthetic zeolites. *Crystals* 10:622.
- Kyriakis, S.C., Papaioannou, D.S., Alexopoulos, C., Polizopoulou, Z., Tzika, E.D., y Kyriakis, C.S. 2002. Experimental studies on safety and efficacy of the dietary use of a clinoptilolite-rich tuff in sows: a review of recent research in Greece. *Microporous and Mesoporous Materials* 51:65-74.
- Laza-knoerr, A.L., y Dumargue, P. 2020. Urea supplement for animal nutrition. Google Patents.
- Li, Y., Li, L., y Yu, J. 2017. Applications of zeolites in sustainable chemistry. *Chem* 3:928-49.
- Mahdavi-rad, N., Chaji, M., Bojarpour, M., y Dehghanbanadaky, M. 2021. Comparison of the effect of sodium bicarbonate, sodium sesquicarbonate, and zeolite as rumen buffers on apparent digestibility, growth performance, and rumen fermentation parameters of Arabi lambs. *Tropical Animal Health and Production* 53:1-12.
- Mallek Z, Fendri I, Khannous L, Ben Hassena A, Traore Al, Ayadi M-A, et al. 2012. Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid. *Lipids in health and disease*. 11(1):1-7.
- Marin, M.P., Pogurschi, E.N., Marin, I., y Nicolae, C.G. 2020. Influence of natural zeolites supplemented with inorganic selenium on the productive performance of dairy cows. *Pakistan journal of zoology* 52:775.
- Martins, G.N., Spinola, V., y Castilho, P.C. 2020. Release of adsorbed ferulic acid in simulated gastrointestinal conditions. *European Food Research and Technology* 246:1297-306.
- Mathew, A.G., Cissell, R., y Liamthong, S. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne pathogens and disease* 4:115-33
- McCullum, F.T., y Galyean, M.L. 1983. Effects of clinoptilolite on rumen fermentation, digestion and feedlot performance in beef steers fed high concentrate diets. *Journal of Animal Science* 56:517-24.
- Meschiatti, M.A., Gouvêa, V.N., Pellarin, L.A., Batalha, C.D., Biehl, M.V., Acedo, T.S., Dórea, J.R., Tamassia, L.F., Owens, F.N., et al. 2019. Feeding the combination of essential oils and exogenous  $\alpha$ -amylase increases performance and carcass production of finishing beef cattle. *Journal of Animal Science* 97:456-71.
- Milenkovic, J., Hrenovic, J., Matijasevic, D., Niksic, M., y Rajic, N. 2017. Bactericidal activity of Cu-, Zn-, and Ag-containing zeolites toward *Escherichia coli* isolates. *Environmental Science and Pollution Research* 24:20273-81.
- Montes-Luna, A.d.J., Fuentes-López, N., Perera-Mercado, Y., Pérez-Camacho, O., Castruita-de León, G., García-Rodríguez, S., y García-Zamora, M. 2015. Caracterización de clinoptilolita natural y modificada con Ca<sup>2+</sup> por distintos métodos físico-químicos para su posible aplicación en procesos de separación de gases. *Superficies y vacío* 28:5-11.
- Mumpton, F. 1998. The role of natural zeolites in agriculture and aquaculture, *Zeo-Agriculture*. Westview Press, Boulder, Colorado.
- Norouziyan, M., Valizadeh, R., Khadem, A., Afzalzadeh, A., y Nabipour, A. 2010. The effects of feeding clinoptilolite on hematology, performance, and health of newborn lambs. *Biological trace element research* 137:168-76.
- Papaioannou, D.S., Kyriakis, S.C., Papasteriadis, A., Roubies, N., Yannakopoulos, A., y Alexopoulos, G. 2002. Effect of in-feed inclusion of a natural zeolite (clinoptilolite) on certain vitamin, macro and trace element concentrations in the blood, liver and kidney tissues of sows. *Research in veterinary science* 72:61-68.
- Patra, A.K., y Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek* 96:363-75.
- Peña-Torres, E.F., González-Ríos, H., Avendaño-Reyes, L., Valenzuela-Grijalva, N.V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazán, A., y Peña-Ramos, E.A. 2019. Ácidos hidroxicoicánicos en producción animal: farmacocinética, farmacodinamia y sus efectos como promotor de crecimiento. *Revisión. Revista mexicana de ciencias pecuarias* 10:391-415.
- Pond, W., Laurent, S., y Orloff, H. 1984. Effect of dietary clinoptilolite or zeolite Na-A on body weight gain and feed utilization of growing lambs fed urea or intact protein as a nitrogen supplement. *Zeolites* 4:127-32.
- Pond, W.G., y Mumpton, F.A. 1984. *Zeo-agriculture: Use of natural zeolites in agriculture and aquaculture*. Westview press.
- Roque-Jiménez, J.A., Pinos-Rodríguez, J.M., Rojo-Rub, R., Mendoza, G.D., Vázquez, A., De Jesus, J.A.C., y Lee-Rangel, H.A. 2018. Effect of natural zeolite on live weight changes, ruminal fermentation and nitrogen metabolism of ewe lambs. *South African Journal of Animal Science* 48.
- Rostami, R., y Jonidi Jafari, A. 2014. Application of an adsorptive-thermocatalytic process for BTX removal from polluted air flow. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 12:1-10.
- Ruiz, O., Castillo, Y., Miranda, M.T., Elias, A., Arzola, C., Rodríguez, C., y La, O. 2007. Niveles de zeolita y sus efectos en indicadores de la fermentación ruminal en ovinos alimentados con heno de alfalfa y concentrado. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41:253-57.
- Sadeghi, A., y Shawrang, P. 2006. The effect of natural zeolite on nutrient digestibility, carcass traits and performance of Holstein steers given a diet containing urea. *Animal Science* 82:163-67.
- Sallam, S.M., Abo-Zeid, H.M., Abaza, M.A., y El-Zaiat, H.M., 2022. Nutrient intake, digestibility, growth performance, and carcass of sheep fed urea-based diet supplemented with natural clinoptilolite. *Animal Science Journal* 93:e13689.

- Servatan, M., Zarrintaj, P., Mahmodi, G., Kim, S.-J., Ganjali, M.R., Saeb, M.R., y Mozafari, M. 2020. Zeolites in drug delivery: Progress, challenges and opportunities. *Drug Discovery Today* 25:642-56.
- Sherwood, D.M., Erickson, G.E., y Klopfenstein, T.J. 2005. Effect of clinoptilolite zeolite on cattle performance and nitrogen volatilization loss. *Nebraska Beef Cattle Reports*:177.
- Song, Z., Huang, Y., Xu, W.L., Wang, L., Bao, Y., Li, S., y Yu, M. 2015. Continuously adjustable, molecular-sieving "gate" on 5A zeolite for distinguishing small organic molecules by size. *Scientific reports* 5:1-7.
- Spears, J.W. 1996. Organic trace minerals in ruminant nutrition. *Animal feed science and technology* 58:151-63.
- Stojković, J., Ilić, Z.Z., Ćirić, S., Ristanović, B., Petrović, M.P., Caro Petrović, V., y Kurcubić, V.S. 2012. Efficiency of zeolite basis preparation in fattening lambs diet. *Biotechnology in Animal Husbandry* 28:545-52.
- Tánori-Lozano, A., Quintana-Romandía, A.I., Montalvo-Corral, M., Pinelli-Saavedra, A., Valenzuela-Melendres, M., Dávila-Ramírez, J.L., Islava-Lagarda, T.Y., y González-Ríos, H. 2022. Influence of ferulic acid and clinoptilolite supplementation on growth performance, carcass, meat quality, and fatty acid profile of finished lambs. *Journal of Animal Science and Technology* 64:274-90.
- Thiel, A., Tippkötter, N., Suck, K., Sohling, U., Ruf, F., y Ulber, R. 2013. New zeolite adsorbents for downstream processing of polyphenols from renewable resources. *Engineering in Life Sciences* 13:239-46.
- Tondar, M., Parsa, M.J., Yousefpour, Y., Sharifi, A.M., y Shetab-Boushehri, S.V. 2014. Feasibility of clinoptilolite application as a microporous carrier for pH-controlled oral delivery of aspirin. *Acta Chimica Slovenica* 61:688-93.
- Toprak, N., Yilmaz, A., Öztürk, E., Yigit, O., y Cedden, F. 2016. Effect of micronized zeolite addition to lamb concentrate feeds on growth performance and some blood chemistry and metabolites. *South African Journal of Animal Science* 46:313-20.
- Urias-Estrada, J.D., López-Soto, M.A., Barreras, A., Aguilar-Hernández, J.A., González-Vizcarra, V.M., Estrada-Angulo, A., Zinn, R.A., Mendoza, G.D., y Plascencia, A. 2017. Influence of zeolite (clinoptilolite) supplementation on characteristics of digestion and ruminal fermentation of steers fed a steam-flaked corn-based finishing diet. *Animal Production Science* 58:1239-45.
- Valpotić, H., Gračner, D., Turk, R., Đuričić, D., Vince, S., Folnožić, I., Lojkić, M., Žura Žaja, I., Bedrica, L., et al. 2017. Zeolite clinoptilolite nanoporous feed additive for animals of veterinary importance: potentials and limitations. *Periodicum biologorum* 119:159-72.
- Valpotić, H., Terzić, S., Vince, S., Samardžija, M., Turk, R., Lacković, G., Habrun, B., Djuricic, D., Sadikovic, M., et al. 2016. In-feed supplementation of clinoptilolite favourably modulates intestinal and systemic immunity and some production parameters in weaned pigs. *Veterinarni medicina* 61:317-27.
- Weitkamp, J., y Puppe, L. 1999. *Catalysis and zeolites: fundamentals and applications*. Springer Science & Business Media.
- White, J.L., y Ohlrogge, A.J. 1983. Ion exchange materials to increase consumption of non-protein nitrogen by ruminants. Google Patents.
- Wu, Q.J., Wang, L.C., Zhou, Y.M., Zhang, J.F., y Wang, T. 2013. Effects of clinoptilolite and modified clinoptilolite on the growth performance, intestinal microflora, and gut parameters of broilers. *Poultry Science* 92:684-92.
- Yuna, Z. 2016. Review of the natural, modified, and synthetic zeolites for heavy metals removal from wastewater. *Environmental Engineering Science* 33:443-54.
- Zayed, M.S., Szumacher-Strabel, M., El-Fattah, D.A.A., Madkour, M.A., Gogulski, M., Stropfová, V., Cieślak, A., y El-Bordeny, N.E. 2020. Evaluation of cellulolytic exogenous enzyme-containing microbial inoculants as feed additives for ruminant rations composed of low-quality roughage. *The Journal of Agricultural Science* 158:326-38.

### **3. INFLUENCE OF FERULIC ACID AND CLINOPTILOLITE SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, CARCASS, MEAT QUALITY, AND FATTY ACID PROFILE OF FINISHED LAMBS**

Ana Tánori-Lozano<sup>1</sup>, Adrián Imanol Quintana-Romandía<sup>1</sup>, Maricela Montalvo-Corral<sup>1</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>1</sup>, Martín Valenzuela-Melendres<sup>1</sup>, José Luis Dávila-Ramírez<sup>2</sup>, Thalia Yamileth Islava-Lagarda<sup>1</sup>, and Humberto González-Rios<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD, A.C.) Hermosillo Sonora, México.

<sup>2</sup>Ciencia Aplicada para el Desarrollo Tecnológico, A.C. (CIADETEC, A.C.) Hermosillo, Sonora, México.

Publicado el 15 de marzo de 2022

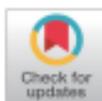
Journal of Animal Science and Technology 2022; 64(2):274-290

<https://doi.org/10.5187/jast.2022.e21>

## Influence of ferulic acid and clinoptilolite supplementation on growth performance, carcass, meat quality, and fatty acid profile of finished lambs

Ana Tánori-Lozano<sup>1</sup>, Adrián Imanol Quintana-Romandía<sup>1</sup>,  
 Maricela Montalvo-Corral<sup>1</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>1</sup>,  
 Martín Valenzuela-Melendres<sup>1</sup>, José Luis Dávila-Ramírez<sup>2</sup>,  
 Thalia Yamileth Islava-Lagarda<sup>1</sup> and Humberto González-Ríos<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.), Hermosillo, Sonora 83304, Mexico  
<sup>2</sup>Ciencia Aplicada para el Desarrollo Tecnológico, A.C. (CIADETEC, A.C.), Hermosillo, Sonora 83260, Mexico



Received: Nov 13, 2021  
 Revised: Jan 19, 2022  
 Accepted: Mar 15, 2022

\*Corresponding author  
 Humberto González-Ríos  
 Centro de Investigación en  
 Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD,  
 A.C.), Hermosillo, Sonora 83304,  
 México.  
 Tel: +52-662-289-2400  
 E-mail: hugory@ciad.mx

Copyright © 2022 Korean Society of  
 Animal Sciences and Technology.  
 This is an Open Access article  
 distributed under the terms of the  
 Creative Commons Attribution  
 Non-Commercial License ([http://  
 creativecommons.org/licenses/by-  
 nc/4.0/](http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)) which permits unrestricted  
 non-commercial use, distribution, and  
 reproduction in any medium, provided  
 the original work is properly cited.

### ORCID

Ana Tánori Lozano  
<https://orcid.org/0000-0002-3180-5122>  
 Adrián Imanol Quintana-Romandía  
<https://orcid.org/0000-0002-2071-8488>  
 Maricela Montalvo-Corral  
<https://orcid.org/0000-0002-0070-7490>  
 Araceli Pinelli-Saavedra  
<https://orcid.org/0000-0003-1487-5767>  
 Martín Valenzuela-Melendres  
<https://orcid.org/0000-0002-7347-9599>

### Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of ferulic acid (FA) and clinoptilolite (CTL) supplementation on the growth performance, carcass characteristics, and meat quality of hair-breed lambs. Twenty-eight Kathadin male lambs ( $33.72 \pm 3.4$  kg) were randomly allocated to one of the four diets ( $n=7$ ) under a  $2 \times 2$  factorial arrangement to evaluate the effect of FA (0 or 300 ppm) and CTL (0% or 1%) during the last 40 days of the finishing phase. No interaction between additives was shown for growth performance, carcass characteristics and meat quality, with exception of the fatty acid profile ( $p < 0.05$ ). FA reduced feed intake and carcass conformation ( $p < 0.05$ ). Wholesale cuts were not affected by FA or CTL ( $p > 0.05$ ). The  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $C^*$  color parameters and some intramuscular fatty acids of the *longissimus thoracis* muscle were positively modified by CTL supplementation ( $p < 0.05$ ). While there was no FA  $\times$  CTL interaction, each additive could be used individually in animal nutrition to improve the feedlot performance and meat quality of the lambs.

**Keywords:** Phytochemicals, Zeolite, Sheep, Carcass evaluation, Feedlot performance

## INTRODUCTION

As a strategy to improve the meat production chain, it is common to use synthetic growth promoters as anabolic agents to enhance animal performance and carcass characteristics [1]. However, synthetic compounds are becoming unfeasible due to consumer concerns and strict regulations in Europe [2], and natural alternatives are more acceptable for use in animal production. The phytochemicals dietary supplementation could be a strategy to improve animal performance with the same beneficial effect as synthetic growth promoters but without compromising animal welfare, meat quality, and consumer health [2–4]. Recently, some researchers have reported that ferulic acid (FA; a secondary

José Luis Dávila-Ramírez  
<https://orcid.org/0000-0002-4297-5426>  
 Thalia Yamileth Islava Lagarda  
<https://orcid.org/0000-0001-8404-2969>  
 Humberto González-Ríos  
<https://orcid.org/0000-0002-7463-778X>

#### Competing interests

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

#### Funding sources

This work was supported by the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. and Carnes Tapeke'nos S.A. de C.V. in Mexico.

#### Acknowledgements

We appreciate the donation of supplies by Roberto Laguna, Felzardo Leon and Geovanni Leyva. We thank the support provided in the laboratory by M.C. Libertad Zamorano, Julio González, Francisco Alday, and Laura Flores. Also, we acknowledge Leonardo Lozano, Sebastian Ibarra, and Carnes Tapeke'nos agricultural operators for their facilities.

#### Availability of data and material

Upon reasonable request, the datasets of this study can be available from the corresponding author.

#### Authors' contributions

Conceptualization: González-Ríos H.  
 Data curation: Tánori-Lozano A, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela-Melendres M.  
 Formal analysis: Tánori-Lozano A, Quintana-Romandía AI, Dávila-Ramírez JL.  
 Methodology: Tánori-Lozano A, Quintana-Romandía AI, Montalvo-Corral M, Valenzuela-Melendres M, Islava-Lagarda TY, González-Ríos H.  
 Investigation: Tánori-Lozano A, Quintana-Romandía AI, Pinelli-Saavedra A, Islava-Lagarda TY, González-Ríos H.  
 Writing - original draft: Tánori-Lozano A, Dávila-Ramírez JL, González-Ríos H.  
 Writing - review & editing: Tánori-Lozano A, Quintana-Romandía AI, Montalvo-Corral M, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela-Melendres M, Dávila-Ramírez JL, Islava-Lagarda TY, González-Ríos H.

#### Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to the local official guidelines for animal care in Mexico, and approved by the Research Ethics Committee of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CEI/002-2/2021).

plant compound with bioactive properties) enhances growth performance, carcass characteristics, and meat quality in ruminants by reducing lipid peroxidation and increasing the average daily gain (ADG) and carcass weight [5–7]. Nevertheless, growth performance and carcass characteristics after FA supplementation in lambs have been inconsistent; in addition, the optimal dose or time exposition has not been established [8–11]. On the other hand, some authors suggest that the moderate growth-promoting effect of phytochemicals such as FA, in the case of ruminants, could be related to their antimicrobial activity, which causes a productive improvement due to the modification of ruminal fermentation [4,12]. However, more studies are required to establish the possible mechanisms of action involved.

On the other hand, clinoptilolite (CTL) a naturally occurring zeolite, is classified as safe and is commercially available for use in diets for broilers and pigs, but it is uncommon to use it in beef cattle production [13,14]. A study has shown that supplementing lambs with CTL increased muscle tissue deposition and decreased fat tissue deposition [15]. Additionally, an improvement in feed efficiency and ADG was reported [16,17]; the ion-exchange property of CTL favorably modulates ruminal fermentation, improving energy efficiency, which is reflected in animal growth performance [18]. However, the available results are conflicting; hence, more research is required in order to fully elucidate CTL's response in ruminants.

There is a lack of studies reporting the effects of FA or CTL on the growth performance and meat quality of lambs. Moreover, the combined effect of both additives has not been studied. Therefore, this research hypothesis was that the simultaneous administration of dietary FA and CTL to hair lambs could synergistically enhance the growth performance, carcass characteristics, and meat quality. This study aims to evaluate the combined effect of the dietary inclusion of FA and CTL on the growth performance, carcass characteristics, meat quality, and chemical composition of finished hair-breed lambs.

## MATERIALS AND METHODS

### Study site

The feedlot performance was carried out during the winter season at a commercial sheep production farm located in northwestern Sonora, Mexico (latitude 28.78°N and longitude 111.40°W). The average temperature and relative humidity during the study were 18 ± 12°C and 49 ± 14%, respectively. The animal slaughter and carcass evaluation were conducted at the Agriculture and Livestock Department (ALD) of the Universidad de Sonora (UNISON), situated 21 km from Hermosillo, Sonora, Mexico. Meat quality, chemical composition, and fatty acid profile were evaluated at the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), also situated in Hermosillo, Sonora.

All animal management and slaughter procedures were conducted in accordance with the official techniques and standards in Mexico (NOM-051-ZOO-1995, NOM-033-ZOO-1995, and NOM-062-ZOO-1999). Furthermore, the Ethics Committee of CIAD accepted and supervised all of the experimental processes (CEI/002-2/2021).

### Animals and treatments

Twenty-eight Katahdin male lambs with similar initial body weight (IBW; 33.74 ± 3.4 kg) were individually housed in pens (2.5 m × 2 m) for this experiment. Seven pens per group were randomly assigned to one of the four experimental diets as follows: (1) control (high concentrate basal diet; BD); (2) FA (BD with 300 ppm FA; Laboratorios Minkab, Guadalajara, Jalisco, Mexico); (3) CTL (BD with 1% CTL; Zeolex®; Grupo Sanfer, Ciudad de México, Mexico); and (4) FAZ (BD with

300 ppm FA + 1% CTL). All animals were given a compound of vitamins (A, D, and E) at the beginning of the study and were treated with Ivermectin (ivermectin + ADE; Virbamec ADE FUERTE; Virbac Mexico, Zapopan, Jalisco, Mexico; 0.7 mL/animal) for eliminating internal and external parasites. Also, each lamb was weighed and identified with a numbered plastic ear tag before being assigned to the experimental diets.

The feeding period was 50 days, ten days for the BD adaptation (12.9% crude protein [CP], 3.2 Mcal/kg feed of metabolizable energy [ME], meeting the recommended nutritional requirements for meat-producing lambs) [19] and the next forty days for the experimental trial. To ensure the daily intake of FA and CTL per lamb, both were mixed with mineral premix and subsequently blended with other ground ingredients to create the corresponding FA or CTL dose (300 ppm or 1%). Finally, the concentrate mixture was incorporated with the remaining ingredients. The ingredients and chemical composition of the experimental diets are indicated in Table 1. Feed was offered *ad libitum* twice a day at 0800 h and 1600 h in half mixed rations, and the lambs had *ad libitum* access to fresh water. Additionally, their health status was monitored daily by direct visual examination.

### Feedlot performance

Animals were individually weighed three times (initial, interim, and final) during the feeding period. From these data, ADG was calculated for the first period (d 0 to 20), the second period (d 21 to 40), and for the whole period (d 0 to 40). Feed intake (feed offered – refusal) was measured daily. At the beginning of the experimental period, dry matter intake was established at 5% of the

**Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental diets offered to the hair lambs**

Item	Treatment <sup>1)</sup>			
	Control	FA	CTL	FAZ
Ingredients (% of DM)				
Wheat straw	10.2	10.2	10	10
Alfalfa hay	12	12	12.1	12.1
Corn grain	61	61	60.1	60.1
Poultry manure	5	5	5	5
Soybean meal	8	8	8	8
Cane molasses	3	3	3	3
Mineral premix	0.5	0.5	0.5	0.5
Salt	0.3	0.3	0.3	0.3
Ferulic acid (ppm)	0	300	0	300
Zeolite (Clinoptilolite)	0	0	1	1
Chemical composition (DM basis)				
Dry matter (%)	88.5	88.5	88.5	88.5
CP (%)	12.9	12.9	12.8	12.8
Ether extract (%)	3.60	3.60	3.61	3.61
Metabolizable energy <sup>2)</sup> (Mcal/kg)	3.25	3.25	3.21	3.21
NEm <sup>2)</sup> (Mcal/ kg)	2.18	2.18	2.15	2.15
NEg <sup>2)</sup> (Mcal/ kg)	1.44	1.44	1.42	1.42

<sup>1)</sup>Control, high concentrate basal diet (BD); FA, BD with 300 ppm ferulic acid; CTL, BD with 1% clinoptilolite; FAZ, BD with 300 ppm FA + 1% CTL.

<sup>2)</sup>Based on tabular energy values of ingredients from NRC [19].

DM, dry matter; CP, crude protein; NEm, net energy for maintenance; NEg, net energy for gain.

live weight, and then, the daily feed ration was adjusted to have a minimum refusal (< 10%). Finally, feed efficiency was indicated as the ratio of daily feed intake to ADG.

#### Carcass characteristics, *longissimus thoracis* muscle sampling, and wholesale cut yields

At the end of the experimental period, the lambs were slaughtered (ALD slaughterhouse) after fasting for 16 h (with access to water). Then, once the lambs were skinned and eviscerated, their carcasses were weighed to determine hot carcass weight (HCW); after chilling the carcasses for 24 h at 4 °C, the cold carcass weight (CCW) was measured. Subsequently, following the methodology described by AMSA [20], carcass conformation was evaluated (numeric scale: 1 = bad to 8 = excellent). The cooling loss was also estimated by the difference between HCW and CCW expressed as a percentage. Moreover, body measurements were registered: carcass length, thorax depth, leg length, and leg perimeter [21].

Then, the carcasses were divided along the midline, and each left side was ribbed between the 12th and 13th ribs to measure the back-fat thickness and loin area using a dot squared grid. Finally, half of the carcasses were weighed and split into forequarters and hindquarters to obtain wholesale cuts: neck, shoulder, loin, ribs and flank, plain loin, and leg [22]. Each cut was expressed as a percentage of the half carcass weight.

#### Meat quality evaluation

At 24 h *postmortem*, the pH from the *longissimus thoracis* (LT) was directly measured between the 12th and 13th ribs with a portable pH meter (model HI 99163, Hanna Instruments, Wilmington, MA, USA) with a puncture electrode. Then, after splitting and weighing each wholesale cut, the LT muscle was dissected from the loin of each left side carcass (located at the top of the 4th and 12th ribs). Subsequently, each muscle sample was vacuum packed, stored, and aged for one week at -18 °C in the Meat Science Laboratory of CIAD. At the end of the aging time, the samples were thawed (24 h at 0 °C) and sectioned following the diagram shown in Fig. 1 to determine final pH, water-holding capacity (WHC), color values, cooking loss, fatty acid profile, and Warner-Bratzler shear force (WBSF).

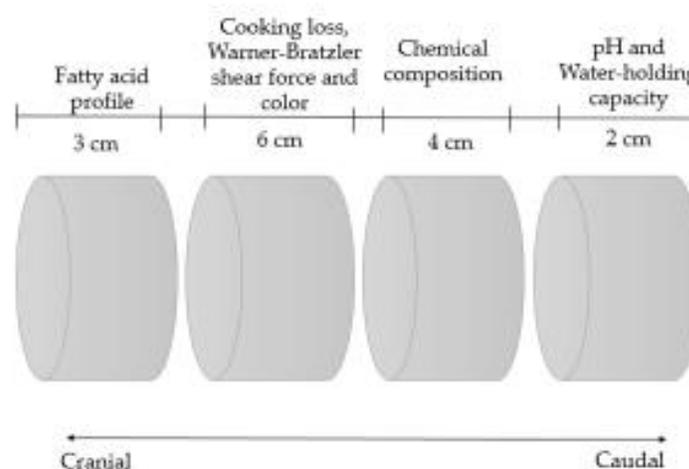


Fig. 1. *Longissimus thoracis* muscle sampling diagram.

To evaluate the final meat pH, each steak was homogenized in distilled water with a meat: water ratio of 1:3 (g:mL). Then, the final meat pH was measured using a benchtop digital pH meter previously calibrated with pH 4 and 7 standards (Model HI-2210, Hanna Instruments Digital, Woonsocket, RI, USA). WHC was evaluated following the technique previously described by Sutton et al. [23]. Meat samples were centrifuged for a lapse of time ( $1,420 \text{ g} \times 5 \text{ min}$ , at  $5^\circ$ ). The WHC value was calculated by the difference between the initial weight (before centrifugation) and final weight (after centrifugation) of the sample, expressed as a percentage.

LT muscle color analysis was conducted after 30 min of blooming using a Minolta CR-2600 colorimeter with illuminant D65 (10° observer and an 8 mm diameter aperture; Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan), where  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  were documented. Chroma ( $C^*$ ; color saturation index) and hue angle ( $H^\circ$ ) were calculated using the redness and yellowness values, according to the Cassens et al. [24] methodology. Five measures were taken directly from the LT muscle surface in distinct locations from each sample.

To evaluate the cooking loss and WBSF, LT samples were weighed raw, and after being cooked until the internal temperature of the steak reached  $71^\circ\text{C}$  (an electric skillet was employed; Cook Master 3222-3, Oster, Mississauga, Ontario, Canada), they were immediately weighed again. Next, the cooked samples were chilled, first, at room temperature ( $22^\circ\text{C}$ – $27^\circ\text{C}$ ), and then, at  $4^\circ\text{C}$  for 24 h. Finally, from each steak, six cores of 3 cm long and  $1.27 \text{ cm}^2$  in cross-section were cut parallel to the muscle fibers and used to evaluate WBSF with a WBSF device (TA.XT Plus Texture Analyzer texturometer, Texture Technologies, Scarsdale, NY, USA). The WBSF value was indicated in kg. The percentage of cooking loss was determined as the ratio of the raw weight to the cooked weight.

#### Chemical composition and fatty acid profile

Moisture, ash, fat, and protein contents of the LT muscle were determined as described by the AOAC standardized procedures [25]. To evaluate the fatty acid profile, lipid extraction was carried out following an adaptation to the Bligh and Dyer [26] procedure with the following modifications: 2 g of meat was mixed with 10 mL of methanol and homogenized (Ultra-Turrax T25, IKA, Staufen, Germany) for 1 minute at  $1,450 \times \text{g}$ . Then, 20 mL of chloroform was added, homogenized again for 2 minutes at  $1,450 \times \text{g}$ , and filtered with Whatman no. 41. Later, three milliliters of KCl (0.88%) was added, and after vigorous shaking, the top layer was poured out. Finally, 4 mL of distilled water and methanol were added to assist separation before the sample was shaken again; the top layer containing the non-lipid fractions was removed, and the lower phase was used for esterification.

Fatty acid methyl esters (FAMEs) were prepared following an adaptation of the standard method described by Li and Watkins [27]. First, samples were placed in a water bath ( $40^\circ\text{C}$ ) with a constant nitrogen gas flow until all solvents were evaporated. Then, 4 mL of NaOH (0.5 N in methanol) was added; later, tubes (previously capped) were placed in a water bath ( $90^\circ\text{C}$ ) for 5 min, and after cooling at room temperature, 5 mL of boron trifluoride ( $\text{BF}_3$ ) was added to the samples and heated in a water bath for 5 min again. Next, when the samples were cooled, 4 mL of hexane was added and then heated for 2 min in a water bath ( $90^\circ\text{C}$ ). Finally, 0.5 g of anhydrous sodium sulfate and 1 mL of saturated NaCl solution were added, and 1 mL of the top lipid phase was carefully collected into a 2 mL gas chromatography sample vial containing 1 mL of hexane.

FAMEs were analyzed using a gas chromatograph (Hewlett Packard model 6890, Waldbronn, Germany) equipped with a flame ionization detector and a capillary column (Agilent J&W DB-23 [0.25mm internal diameter  $\times$  60 m; 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness]). The chromatographic conditions were as previously described by González-Ríos et al. [5]. Identification of each FAME was based on the retention times compared with those from a known standard (tridecanoic acid; 13:0,

Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Data are expressed as the percentage of total fatty acids identified. Nutritional ratios (polyunsaturated fatty acid [PUFA] / saturated fatty acid [SFA], monounsaturated fatty acid [MUFA] / SFA, and n-6 / n-3) were calculated as well as the total amounts of PUFA, MUFA, and SFA.

### Statistical analysis

Data acquired from the study were analyzed with the NCSS statistical program (version 2007, NCSS, Kaysville, Utah, USA). Data from feedlot performance, carcass characteristics, wholesale cuts, meat quality, chemical composition, and fatty acid profile were analyzed as a 2 × 2 factorial under a complete randomized design. The model considered fixed effects of dietary supplementation of FA and CTL and their interaction (CTL × FA). For feedlot performance variables, IBW was included as a covariate in the model. Differences among means were compared using the Tukey-Kramer test. Significances were considered when  $P < 0.05$ , and a trend was declared when  $0.05 < P < 0.10$ .

## RESULTS

### Feedlot performance

Table 2 presents the influence of dietary supplementation with FA and CTL on hair-breed lamb feedlot performance. No variable throughout the feeding trial or by period was affected by the FA × CTL interaction ( $P > 0.05$ ). Neither IBW nor final body weight differed between experimental diets ( $P > 0.05$ ). Additionally, ADG, feed intake, and feed conversion were not affected ( $P > 0.05$ ) during the 40 d trial period. Lambs supplemented with CTL tended to increase their daily feed intake through each period by 7.5% (d 0 to 20;  $P = 0.088$ ) and 7.6% (d 21 to 40;  $P = 0.054$ ), while feed conversion tended ( $P = 0.065$ ) to be higher in the second period; however, this trend was not shown during overall feeding period (d 0 to 40;  $P > 0.05$ ). Moreover, from d 21 to 40, dietary

**Table 2.** Feedlot performance of the hair lambs supplemented with FA and CTL

Item	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
Initial body weight (kg)	34.10	33.39	33.78	33.70	0.97	0.619	0.956	0.619
Final body weight (kg)	45.55	45.39	45.57	45.37	0.65	0.866	0.833	0.673
Period 1 (d 0–20)								
Average daily gain (kg/d)	0.248	0.259	0.249	0.258	0.03	0.736	0.787	0.456
Feed intake (kg/d, DM)	1.40	1.34	1.32	1.42	0.05	0.310	<b>0.088</b>	0.508
Feed conversion (kg DM)	5.74	5.44	5.19	5.99	0.56	0.618	0.182	0.641
Period 2 (d 21–40)								
Average daily gain (kg)	0.343	0.330	0.349	0.324	0.03	0.708	0.444	0.740
Feed intake (kg/d, DM)	1.69	1.57	1.57	1.69	0.05	<b>0.039</b>	<b>0.054</b>	0.995
Feed conversion (kg DM)	4.54	4.91	4.35	5.11	0.37	0.357	<b>0.065</b>	0.488
Total (d 0–40)								
Average daily gain (kg/d)	0.295	0.291	0.296	0.291	0.02	0.866	0.833	0.673
Feed intake (kg/d, DM)	1.52	1.46	1.45	1.53	0.05	0.264	0.142	0.809
Feed conversion (kg DM)	5.30	5.25	5.06	5.49	0.46	0.913	0.381	0.545

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial.

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of clinoptilolite through the 40-d feeding.

FA, ferulic acid; CTL, clinoptilolite; DM, dry matter.

FA decreased lamb daily feed intake by 7% ( $p < 0.05$ ), but this reduction did not affect their feed conversion ( $p > 0.05$ ).

**Carcass characteristics and wholesale cuts yield**

Regarding the carcass characteristics, no significant FA × CTL interaction ( $p > 0.05$ ) was shown (Table 3). Neither FA nor CTL had an effect on HCW, CCW, dressing weight, fat thickness, or loin area ( $p > 0.05$ ; Table 3). However, the cooling loss value of the carcass from lambs supplemented only with CTL tended to be 47% lower ( $p = 0.072$ ). In addition, dietary FA did affect the carcass conformation ( $p < 0.05$ ); nevertheless, the conformation score was lower for this group (7.4%; Table 3). No FA × CTL interaction or FA main effect ( $p > 0.05$ ) was presented for any of the body measurements (Table 3). On the other hand, while CTL tended ( $p = 0.057$ ) to increase leg length (4%), other variables (carcass length, thorax depth, and leg perimeter) remained unaltered ( $p > 0.05$ ). Wholesale cuts yield are presented in Table 4. Dietary FA, CTL, or their interaction (FA × CTL) did not impact ( $p > 0.05$ ) any wholesale cut yield of the hair-breed lambs: neck, shoulder, loin, ribs and flank, plain loin, or leg.

**Table 3. Carcass characteristics of the hair lambs supplemented with FA and CTL**

Item	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
HCW (kg)	22.46	21.91	22.33	22.03	0.49	0.304	0.573	0.164
CCW (kg)	22.00	21.50	21.83	21.68	0.49	0.356	0.776	0.134
Cooling loss (%)	1.15	1.11	1.48	0.78	0.35	0.910	<b>0.072</b>	0.325
Dressing weight (%)	48.13	47.13	47.92	47.34	0.95	0.328	0.573	0.565
Conformation (units)	6.46	5.98	6.32	6.12	0.20	<b>0.036</b>	0.355	0.583
Fat thickness (mm)	1.57	1.88	1.82	1.62	0.23	0.206	0.419	0.176
Loin area (cm <sup>2</sup> )	16.43	15.44	15.42	16.44	0.86	0.289	0.277	0.769
Body measurements (cm)								
Carcass length	64.13	64.92	65.06	64.00	1.38	0.592	0.475	0.859
Thorax depth	18.38	18.30	18.44	18.24	0.31	0.805	0.557	0.879
Leg length	38.68	37.57	37.35	38.91	0.72	0.161	<b>0.057</b>	0.305
Leg perimeter	43.97	43.73	44.39	43.55	0.76	0.767	0.724	0.182

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial.

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of clinoptilolite through the 40-d feeding.

FA, ferulic acid; CTL, clinoptilolite; HCW, hot carcass weight; CCW, cold carcass weight.

**Table 4. Wholesale cuts of the hair lambs supplemented with FA and CTL**

Item	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
Neck (%)	8.66	7.60	8.31	7.94	0.64	0.134	0.592	0.957
Shoulder (%)	29.02	30.26	29.51	29.77	0.96	0.238	0.800	0.374
Loin (%)	7.99	8.01	8.30	7.70	0.60	0.974	0.358	0.679
Ribs and flank (%)	14.08	13.79	14.13	13.74	0.72	0.702	0.613	0.574
Plain loin (%)	11.35	11.17	12.10	10.42	1.57	0.913	0.321	0.424
Leg (%)	29.21	28.44	27.33	30.31	1.67	0.868	0.109	0.524

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial.

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of clinoptilolite through the 40-d feeding.

FA, ferulic acid; CTL, clinoptilolite.

### Meat quality evaluation

Neither the FA × CTL interaction nor the additives themselves had any impact on pH 24 h, WHC, cooking loss, or WBSF ( $p > 0.05$ ) (Table 5). The final pH was unaltered ( $p > 0.05$ ) by FA or CTL supplementation, while their interaction (FAZ treatment) tended ( $p = 0.095$ ) to decrease the final FAZ sample pH (pH = 5.67; unpublished raw data from the study). Regarding color variables, dietary FA did not have any effect on the L\*, a\*, b\*, or C\* values ( $p > 0.05$ ; Table 5). On the other hand, dietary CTL improved ( $p < 0.05$ ) the L\*, a\*, and C\* values, whereas it tended to increase yellowness (b\*;  $p = 0.070$ ). The hue angle (H\*) remained unaltered for all treatments ( $p > 0.05$ ).

### Chemical composition and fatty acid profile

The chemical composition of the lamb meat is shown in Table 6. In general, the chemical composition of the lamb meat was not influenced ( $p > 0.05$ ) by the additives themselves or by their interaction in terms of moisture, ash, fat, or protein contents. Table 7 presents the influence of dietary supplementation with FA and CTL on the fatty acid profile of the intramuscular fat of hair lambs. Palmitic (C16:0), stearic (C18:0), and oleic (C18:1n7c) acids represent the greatest proportion of the fatty acid profile of the lambs' LT muscle in all treatments. FA supplementation did not have any effect ( $p > 0.05$ ) on the fatty acid profile of the lamb meat, whereas the CTL and FA × CTL interaction modified the content of some fatty acids (Table 7). CTL increased ( $p <$

**Table 5.** Effect of FA and CTL on meat quality of the hair lambs

Item	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
pH 24 h	5.50	5.49	5.53	5.45	0.08	0.923	0.391	0.317
Final pH	6.01	5.76	5.86	5.92	0.142	0.116	0.686	<b>0.095</b>
WHC (%)	79.52	81.41	80.79	80.14	1.30	0.183	0.639	0.612
Color variables								
L*	38.63	38.09	37.43	39.28	0.804	0.527	<b>0.041</b>	0.703
a*	17.83	17.54	16.91	18.46	0.642	0.688	<b>0.034</b>	0.178
b*	8.83	8.34	7.93	9.24	0.649	0.482	<b>0.070</b>	0.167
Chroma (C*)	19.91	19.45	18.70	20.66	0.837	0.604	<b>0.038</b>	0.160
Hue angle (H*)	26.22	25.09	24.93	26.39	1.07	0.328	0.209	0.265
Cooking loss (%)	15.97	17.21	17.30	15.87	1.98	0.558	0.500	0.456
WBSF (kg)	7.36	6.80	7.60	6.56	0.850	0.539	0.258	0.623

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial.

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of cinopitilite through the 40-d feeding.

FA, ferulic acid; CTL, cinopitilite; WHC, water-holding capacity; WBSF, Warner-Bratzler shear force.

**Table 6.** Chemical composition of meat from hair lambs supplemented with FA and CTL

Chemical composition (%)	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
Moisture	72.11	73.05	73.32	71.84	0.928	0.350	0.143	0.697
Ash	0.98	0.98	0.98	0.98	0.031	0.893	0.793	0.102
Fat	4.19	5.39	4.64	4.94	1.109	0.310	0.794	0.194
Protein	21.74	20.64	21.30	21.08	0.768	0.182	0.791	0.219

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial.

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of cinopitilite through the 40-d feeding.

FA, ferulic acid; CTL, cinopitilite.

**Table 7.** Fatty acids profile of the *longissimus thoracis* muscle from hair lambs supplemented with FA and CTL

Fatty acid (%)	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
C10:0	0.11	0.13	0.11	0.13	0.007	0.108	<b>0.038</b>	0.266
C12:0	0.08	0.09	0.09	0.08	0.008	0.558	0.150	0.203
C14:0	2.01	2.06	2.18	1.89	0.114	0.728	<b>0.035</b>	0.138
C14:1	0.76	0.72	0.62	0.868	0.074	0.649	<b>0.008</b>	0.672
C15:0	0.61	0.58	0.54	0.658	0.043	0.541	<b>0.039</b>	0.672
C15:1	1.38	1.39	1.36	1.408	0.189	0.963	0.846	0.462
C16:0	22.53	21.91	22.84	21.60	0.591	0.338	<b>0.068</b>	0.647
C16:1	2.65	2.35	2.45	2.553	0.157	0.122	0.606	0.278
C17:0	1.56	1.55	1.56	1.555	0.080	0.947	0.911	<b>0.098</b>
C17:1	1.00	1.05	0.94	1.107	0.098	0.642	0.152	0.152
C18:0	15.88	15.17	15.78	15.27	0.497	0.211	0.365	<b>0.019</b>
C18:1 $\omega$ 9c	42.56	42.20	42.37	42.4	0.602	0.586	0.964	0.939
C18:2 $\omega$ 6t	0.48	0.44	0.45	0.479	0.028	0.190	0.319	<b>0.019</b>
C18:2 $\omega$ 6c	5.68	5.65	5.33	6.01	0.378	0.946	0.116	0.680
C18:3 $\omega$ 3	0.38	0.40	0.39	0.39	0.034	0.616	0.963	<b>0.043</b>
C20:1 $\omega$ 9	0.15	0.18	0.19	0.14	0.029	0.301	<b>0.060</b>	0.288
C20:2	0.32	0.36	0.34	0.34	0.047	0.466	0.944	0.229
C20:3 $\omega$ 6	2.02	1.89	1.89	2.01	0.132	0.365	0.418	<b>0.097</b>
C20:5 $\omega$ 3	0.27	0.26	0.28	0.25	0.044	0.814	0.575	0.148
C24:0	0.33	0.37	0.37	0.34	0.035	0.350	0.475	0.102

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of clinoptilolite through the 40-d feeding

FA, ferulic acid; CTL, clinoptilolite.

0.05) the percentages of C10:0, C14:1, and C15:0 (18, 40, and 22%, respectively) in comparison to animals not supplemented; meanwhile, C14:0 decreased ( $p > 0.05$ ) 13.30% by CTL supplementation. Additionally, CTL tended to reduce C16:0 ( $p = 0.068$ ; 5.4%) and C20:1 $\omega$ 9 ( $p = 0.060$ ; 26.3%). Regarding C18:0, C18:2 $\omega$ 6t, and C20:3 $\omega$ 6, the FA x CTL interaction increased ( $p < 0.05$ ) the content of the aforementioned fatty acids while it tended to increase C17:0 ( $p = 0.098$ ) and C20:3 $\omega$ 6 ( $p = 0.097$ ). No FA x CTL interaction or FA main effect ( $p > 0.05$ ) was presented for any of the sums of fatty acids and nutritional indices of lamb meat (Table 8). However, while CTL tended to increase the sum of PUFAs ( $p = 0.053$ ; 12.04%) and n-6 ( $p = 0.066$ ; 11.87%) and the PUFA/SFA ratio ( $p = 0.070$ ; 21.05%), the other sums and nutritional indices remained unaltered ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSSION

The findings of the present study did not show any additive or synergistic effect in the supplemented animals that could support our hypothesis; therefore, the discussion focuses on the individual impact of each supplement.

### Feedlot performance

The mechanism of action of FA has not been fully elucidated. Based on previous studies with this compound, it has proposed different mechanisms of action involved in the growth-promoting effect of FA: 1) FA could enhance animal performance by reducing their oxidative stress [28]. 2) FA

Table 8. Sums of fatty acids and nutritional indices value of the longissimus thoracis muscle from hair lambs supplemented with FA and CTL

Item	FA (ppm) <sup>1</sup>		CTL (%) <sup>2</sup>		SEM	p-value		
	0	300	0	1		FA	CTL	FA × CTL
∑ SFA	43.2	44.06	44.71	42.55	1.40	0.556	0.155	0.908
∑ MUFA	47.34	47.72	46.86	48.20	1.13	0.760	0.286	0.510
∑ PUFA	9.42	9.07	8.72	9.77	0.48	0.494	<b>0.063</b>	0.311
MUFA / SFA	1.06	1.07	1.05	1.09	0.059	0.948	0.501	0.613
PUFA / SFA	0.21	0.21	0.19	0.23	0.017	0.788	<b>0.070</b>	0.114
∑ n-3	0.65	0.66	0.65	0.65	0.068	0.871	0.983	0.686
∑ n-6	8.41	8.02	7.75	8.67	0.438	0.418	<b>0.066</b>	0.484
n-6 / n-3	13.70	12.29	12.89	13.30	1.09	0.218	0.581	0.869

<sup>1</sup>Lambs fed 0 or 300 ppm of ferulic acid through the 40-d feeding trial.

<sup>2</sup>Lambs fed 0 or 1% of clinoptilolite through the 40-d feeding.

FA, ferulic acid; CTL, clinoptilolite; SFA, saturated fatty acid; MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

has a similar action mechanism to beta-agonists (βAAs) due to the similarities of their molecular structures [29,30]. 3) FA acts as a modulator of ruminal fermentation [12,31].

In our current study, we have no clear information to explain why FA supplementation did not improve feedlot performance traits, carcass characteristics, or wholesale cuts of the finished lambs. In agreement with our results, other studies reported that dietary FA administration did not affect the growth performance of hair lambs [8–10,32]. Contrary to our results, Peña-Torres et al. [30] observed that feeding FA (300 ppm and 600 ppm) enhanced the ADG of lambs; however, in that study, the lambs had a lower body weight and age than the animals in our study. This growth-promoting effect reported in the last study can be related to the high growth rate of the lambs at younger ages, which is usually the period when lambs have continuous growth without reaching their inflection point in the growth curve [33]. Nevertheless, an anabolic effect has been shown in other species, such as pigs and beef cattle [7,34]. Further research on beta-adrenergic receptor (β-AR; subtypes β1, β2 and β3) gene expression or receptor binding affinity evaluation is needed to elucidate these inconsistencies between species.

Based on the aforementioned β-AR gene expression, Valenzuela-Grijalva et al. [29] studied the change in pigs' skeletal muscle mRNA abundance after FA supplementation. β2-AR mRNA expression was increased by FA intake. Baxa et al. [35] reported a similar effect in finishing steers by zilpaterol hydrochloride supplementation. It is worth mentioning that the β2-AR subtype is predominant in bovine and porcine skeletal muscle [36]. On the other hand, Ekpe et al. [37] found an increase in the receptor density of β1-AR in sheep under feed restriction and observed a trend toward cold stress. Previous studies have reported a low plasma concentration of endogenous catecholamines in lambs under thermoneutral conditions. Thus, there might be a lower activation of skeletal muscle β-receptors, which results in less receptor binding affinity [37,38]. These observations suggest that in pigs and beef cattle, FA stimulates β2-AR to promote a growth effect, while in lambs, FA behaves differently.

Based on the above, the lack of effects on the feedlot performance of lambs supplemented with FA can be explained. However, the lambs in our study significantly decreased their feed intake without affecting their performance, which could represent an advantage in meat production development because feeding is an element that elevates production costs. In contrast with our results, other studies with lambs found no effect of FA or feruloyl oligosaccharides on feed intake [8–10,32]. Additionally, published reports have studied the effect of supplementing lambs with different phytochemicals or plant extracts; their results have shown that feeding these compounds

either increased or did not affect the feed intake of fattening lambs [39]. In our study, a decrease in feed intake was only present in the second period (days 21 to 40), and this reduction did not affect the lambs' weight gain. In this regard, prolonged feeding of FA could positively modify the ruminal environment and, consequently, some ruminal fermentation patterns, nutrient digestion, or energy utilization [12,31].

On the other hand, dietary supplementation of fattening lambs with CTL tended to increase feed intake in each experimental period. Similarly, several studies have reported that CTL supplementation increased the daily feed intake of livestock [13,40,41]. Otherwise, the lambs' weight gain in our experiment was not affected by CTL supplementation, while in other studies, dietary supplementation with CTL has been proven to increase weight gain in lambs [18,40,41]. This lack of effect on the weight gain of the lambs might be due to the limited sample size used in our study. On the other hand, Pond et al. [42] mentioned that a CTL advantage on lamb growth performance appeared when diets contained an intact protein source and a high protein level. According to the previous study, it is suggested that high protein intake elevates plasma urea-nitrogen and ruminal ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) concentrations [42]. Since CTL has a high  $\text{NH}_4^+$  binding capacity,  $\text{NH}_4^+$  ions are immediately exchanged for the compensating cation of the zeolite and held there until they are released when saliva enters the rumen during rumination. It is possible that the dosed release of  $\text{NH}_4^+$  ions enhanced ruminal bacteria growth, which in turn could improve ruminal fermentation patterns and microbial protein production. Moreover, Abdelrahman et al. [41] observed that lambs treated with 1% zeolite presented a similar performance to the lambs of the control group, while lambs fed with 2% zeolite showed a better growth performance. In the present work, the failure of CTL to affect weight gain in hair-breed lambs might be due to either an inappropriately low dose of CTL (chosen in this study) or balanced protein intake.

#### Carcass characteristics and wholesale cuts yield

FA supplementation did not affect either the carcass characteristics or the wholesale cuts. The only change shown in these traits was a reduction in the conformation of the FA carcasses. The lack of effects of FA in our results is in accordance with [9,10,30] findings. In contrast, Peña-Torres et al. [6] found that by including 250 ppm FA in the diet of heifers, dressing weight and loin area were improved. In addition, previous studies have shown that phytochemicals and plant extracts did not alter carcass characteristics in fattening lambs [39]. Although our values were within the reference ranges, the lack of an effect on the carcass traits and wholesale cuts suggests that FA supplementation does not have anabolic stimulation in hair-breed lambs, as shown in younger lambs and other species [7,9,29,30]. Since the results of carcass characteristics and wholesale cuts have not been consistent throughout studies, these inconsistencies may be due to the growth effect shown by FA is associated with the breed, sex, species, environmental conditions, or the dose used [43].

Regarding CTL addition, there was no evidence of remarkable effects on carcass characteristics and wholesale cuts. Previous reports indicate that CTL did not affect any carcass characteristics of hair-breed lambs [15,40,43]. Since the CTL supplementation did not improve lambs' muscular development in our study, consequently, no changes in carcass characteristics were expected. Deligiannis et al. [40] reported that lambs supplemented with 3% of CTL showed a better weight gain with no change on carcass traits. Similarly, other studies have reported that CTL supplementation enhances weight gain (carcass characteristics were not evaluated) [17,41,42]. The effects of CTL supplementation in lambs in other studies, could be related to the ability of CTL to modify ruminal fermentation due to its cation exchange property, resulting in better energy efficiency by improving the acetate:propionate ratio or by stimulating some populations of ruminal bacteria [18,44,45].

### Meat quality

In the present study, FA supplementation did not affect the meat quality of hair lambs. These parameters (pH, WHC, cooking loss, color, and WBSF) were maintained within the reported values for lambs [9,46–48]. The lack of effects on color parameters between groups is consistent with previous reports with FA supplementation [6,9,48]. It has been reported that phytochemicals that exhibited antioxidant properties could delay metmyoglobin formation by reducing myoglobin and lipid oxidation, improving meat color stability [5,49]; however, FA did not show any antioxidant properties in our study. Phytochemicals (such as FA) are biotransformed by methylation, glucuronidation, and sulphation into conjugated metabolites because the body recognizes phytochemicals as xenobiotics. Therefore, after intake, concentrations of phytochemicals remain relatively low. Thus, these metabolites can partially reach the target tissues. Besides, they are rapidly excreted via urine and bile [28], limiting their tissue accumulation.

To our knowledge, this is the first report to evaluate meat quality in hair lambs supplemented with CTL. Meat quality characteristics (WHC, pH, WBSF, and cooking loss) were not influenced by CTL supplementation. The only change shown in these traits was an increase in some color variables. Information about the influence of CTL on meat color parameters is limited. In the current study, CTL supplementation improved  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $C^*$  in the meat of lambs. In contrast, Hcini et al. [13] reported no change in the color of breast meat of turkeys supplemented with 1% and 2% CTL. No antioxidant status of lambs was measured in this work; however, the improvement observed in color parameters of lamb meat could be attributed to the antioxidant activity of CTL [49]. The antioxidant capacity of CTL is associated with the scavenging of reactive oxygen species (ROS) and transition metals or to the increased activity of endogenous antioxidant enzymes (glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase, and nitric oxide synthase) by offering cofactors such as trace elements selenium, copper, zinc, and manganese within the CTL structure [13,50]. As mentioned above, we hypothesize that the microelements contained in CTL could reach muscle tissue and perform its antioxidant activity. However, future research is needed to demonstrate the fate and effect of CTL on meat quality of lambs.

### Chemical composition and fatty acid profile

The addition of FA or CTL to the lamb diet did not negatively affect the chemical composition of lamb meat. Moisture, ash, fat, and protein were maintained within the range reported by other authors [46,47] for hair lambs. Since the fat content was slightly higher than that reported in other studies, we believe that this result may be attributed to the older lambs used in this study. Mature animals deposit around 85% of their energy as fat [51].

In the current study, FA supplementation did not change the fatty acid profile, the overall fatty acids, or the nutritional indices of hair lambs, whereas CTL and FA × CTL positively modified the fatty acid profile. In agreement with our findings, Mallek et al. [52] reported a decrease in myristic (C14:0), palmitic (C16:0), and stearic (C18:0) acids in broilers' fatty acid profile by zeolite supplementation as well as an increase in linolenic acid (C18:3 $\omega$ 3). Additionally, a study reported a reduction in DHA (C22:6 n-3) and eicosenoic acid (C20:1 n-9) in lambs' fatty acid profile by monensin sodium supplementation (33 mg/kg of Rumensin 200® for 70 d) [53]. The potential pathways by which CTL or FA × CTL modify lambs' fatty acid profile is unclear, but an enhancement of the fatty acid desaturase activity [13,52] or changes in the rumen microbial population [53,54], could be involved.

Fatty acids desaturases such as  $\Delta$ 9-desaturase introduce a double bond across carbons of a SFAs carbon chain. A study reported that a higher desaturase product in the muscle of supplemented kids (*Terminalia chebula* extract 2 and 6 mg/mL of rumen volume) is due to the action of the

$\Delta 9$ -desaturase enzyme, suggesting that the desaturase activity was influenced by the presence of phenolic compounds [55]. Also,  $\Delta 9$ -desaturase activity could be regulated by some elements in CTL [13,50,52]. Concerning the second pathway proposed, CTL ion-exchange activity may modify the ruminal environment, resulting in changes in the rumen microbial population, especially in cellulolytic bacteria [44]. Cellulolytic bacteria such as *Ruminococcus albus* y *Butyrivibrio* sp. are placed in the first group of rumen bacteria which hydrogenate unsaturated fatty acids. *Butyrivibrio fibrisolvens* have been used to explore the multiple biohydrogenation (BH) pathways. These bacteria can hydrogenate linoleic and alpha-linolenic acids to a conjugated form as the final product (without forming stearic acid as the end products) [54]. Based on the aforementioned, our results could be caused by a regulation of  $\Delta 9$ -desaturase activity or by a slight inhibition of the BH of unsaturated fatty acids [53,54], which may increase the total PUFA, n-6, and n-3 contents and enhance their nutritional ratios. Nevertheless, further studies are needed to show whether changes in fatty acid profile were modified via regulation of  $\Delta 9$ -desaturase activity or by changes in the ruminal microbial population.

In addition, although the  $\Sigma$  PUFA,  $\Sigma$  n-6, and PUFA/SFA ratios in our results did not reach significance, these values tended to improve, which may lead to healthier meat from a nutritional viewpoint [56]. Recently, there has been an interest in improving the nutritional indices of meat, as high values of PUFA/SFA and n-6/n-3 ratios represent a risk factor for cancer and coronary heart disease. The recommended ratio of n-6/n-3 is less than 4, and PUFA/SFA should be above 0.4 [56]. In general, in this study, the n-6/n-3 ratio was high for all treatments, which may have occurred due to the low content of omega-3 fatty acids found in our results. In the current work, DHA (C22:6 n-3) was not detectable, and eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5 n-3) was found at a low concentration in lamb meat [47,53,57] in all treatments, which could explain the undesirably high n-6/n-3 ratio found in this work.

## CONCLUSION

Feeding FA and CTL did not have any combined effect on the growth performance, carcass characteristics, wholesale cut yields, or meat quality of hair lambs. This study provides information about how adding FA reduces daily feed intake without compromising weight gain, which could represent an advantage for lowering feeding costs.

Additionally, this experiment provides new evidence that CTL supplementation improves some meat quality traits and the fatty acid profile of hair lambs. Nevertheless, further studies in ruminants, including a high CTL dose, are needed in order to understand the conditions of CTL beneficial effects on feedlot performance traits.

Factors such as dosage, age, diet composition, and environmental conditions need more investigation to elucidate the beneficial effects of FA and CTL supplementation on hair lambs. Besides, further research is necessary to investigate the effects of FA and CTL supplementation on the ruminal fermentation parameters and microbial populations of the rumen of hair-breed lambs to complement the findings in this work.

## REFERENCES

1. Heitzman RJ. The efficacy and mechanism of action of anabolic agents as growth promoters in farm animals. *J Steroid Biochem.* 1979;11:927-30. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90032-3](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90032-3)
2. Gonzalez Ronquillo M, Angeles Hernandez JC. Antibiotic and synthetic growth promoters in

- animal diets: review of impact and analytical methods. *Food Control*. 2017;72:255-67. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>
3. Dávila-Ramírez JL, Avendaño-Reyes L, Macías-Cruz U, Torreniera-Olivera NG, Zamorano-García L, Peña-Ramos A, et al. Effects of zilpaterol hydrochloride and soybean oil supplementation on physicochemical and sensory characteristics of meat from hair lambs. *Small Rumin Res*. 2013;114:253-7. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.07.009>
  4. Lillehoj H, Liu Y, Calsamiglia S, Fernandez-Miyakawa ME, Chi F, Cravens RL, et al. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Vet Res*. 2018;49:76. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0562-6>
  5. González-Ríos H, Dávila-Ramírez JL, Peña-Ramos EA, Valenzuela-Melendres M, Zamorano-García L, Islava-Lagarda TY, et al. Dietary supplementation of ferulic acid to steers under commercial feedlot feeding conditions improves meat quality and shelf life. *Anim Feed Sci Technol*. 2016;222:111-21. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.10.011>
  6. Peña-Torres EF, Dávila-Ramírez JL, Peña-Ramos EA, Valenzuela-Melendres M, Pinelli-Saavedra A, Avendaño-Reyes L, et al. Effects of dietary ferulic acid on growth performance, carcass traits and meat quality of heifers. *J Sci Food Agric*. 2021;101:548-54. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10666>
  7. González Ríos H, Lozano DAG, Mir AB. Ferulic acid as feed supplement in beef cattle to promote animal growth and improve the meat quality of the carcass and the meat. United States patent US 20130041036A1. 2013 Fed 14.
  8. Wang Y, Wang W, Wang R, Meng Z, Duan Y, An X, et al. Dietary supplementation of ferulic acid improves performance and alleviates oxidative stress of lambs in a cold environment. *Can J Anim Sci*. 2019;99:705-12. <https://doi.org/10.1139/cjas-2018-0200>
  9. Valadez-García KM, Avendaño-Reyes L, Díaz-Molina R, Mellado M, Meza-Herrera CA, Correa-Calderón A, et al. Free ferulic acid supplementation of heat-stressed hair ewe lambs: oxidative status, feedlot performance, carcass traits and meat quality. *Meat Sci*. 2021;173:108395. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108395>
  10. Macías-Cruz U, Perard S, Vicente R, Álvarez FD, Torreniera-Olivera NG, González-Ríos H, et al. Effects of free ferulic acid on productive performance, blood metabolites, and carcass characteristics of feedlot finishing ewe lambs. *J Anim Sci*. 2014;92:5762-8. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8208>
  11. Soberon MA, Cherney DJR, Cherney JH. Free ferulic acid uptake in ram lambs. *J Anim Sci*. 2012;90:1885-91. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4356>
  12. Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim Feed Sci Technol*. 2012;176:78-93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
  13. Hcini E, Slima AB, Kallel I, Zormati S, Traore AI, Gdoura R. Does supplemental zeolite (clinoptilolite) affect growth performance, meat texture, oxidative stress and production of polyunsaturated fatty acid of Turkey poults? *Lipids Health Dis*. 2018;17:177. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0820-7>
  14. Valpotić H, Gračner D, Turk R, Đuričić D, Vince S, Folnožić I, et al. Zeolite clinoptilolite nanoporous feed additive for animals of veterinary importance: potentials and limitations. *Period Biol*. 2017;119:159-72. <https://doi.org/10.18054/pb.v119i3.5434>
  15. Coronel-Burgos F, Plascencia A, Castro-Pérez BI, Contreras-Pérez G, Barreras A, Estrada-Angulo A. Influencia de la sustitución parcial del maíz y de la pasta de soja por zeolita en ovinos en etapa de finalización: características de la canal, composición tisular y masa visceral. *Arch Zootec*. 2017;66:223-8. <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2325>

16. Estrada-Angulo A, Coronel-Burgos F, Castro Pérez BI, López Soto MA, Barreras A, Angulo-Montoya C, et al. Efecto de la inclusión de zeolita (clinoptilolita) en ovinos en etapa de finalización: respuesta productiva y energética de la dieta. *Arch Zootec.* 2017;66:381-6. <https://doi.org/10.21071/az.v66i255.2514>
17. Roque-Jiménez JA, Pinos-Rodríguez JM, Rojo-Rub R, Mendoza GD, Vazquez A, Cayetano De Jesus JA, et al. Effect of natural zeolite on live weight changes, ruminal fermentation and nitrogen metabolism of ewe lambs. *S Afr J Anim Sci.* 2018;48:1148-55. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i6.19>
18. Toprak NN, Yilmaz A, Öztürk E, Yigit O, Cedden F. Effect of micronized zeolite addition to lamb concentrate feeds on growth performance and some blood chemistry and metabolites. *S Afr J Anim Sci.* 2016;46:313-20. <https://doi.org/10.4314/sajas.v46i3.11>
19. NRC [National Research Council], Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants. Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, DC: The National Academies Press; 2007.
20. AMSA [American Meat Science Association]. Meat evaluation handbook. Savoy, IL: American Meat Science Association; 2001.
21. Parés-Casanova PM. Morphometric dimensions allow differentiation of lamb carcasses for some breeds. *Egypt J Sheep Goats Sci.* 2013;8:167-70. <https://doi.org/10.12816/0005038>
22. Avendaño-Reyes L, Macías-Cruz U, Álvarez-Valenzuela FD, Águila-Tepato E, Torrentera-Olivera NG, Soto-Navarro SA. Effects of zilpaterol hydrochloride on growth performance, carcass characteristics, and wholesale cut yield of hair-breed ewe lambs consuming feedlot diets under moderate environmental conditions. *J Anim Sci.* 2011;89:4188-94. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-3904>
23. Sutton DS, Ellis M, Lan Y, McKeith FK, Wilson ER. Influence of slaughter weight and stress gene genotype on the water-holding capacity and protein gel characteristics of three porcine muscles. *Meat Sci.* 1997;46:173-80. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00006-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00006-5)
24. Cassens RG, Demeyer D, Eikelenboom G, Honikel KO, Johansson G, Nielsen T, et al. Recommendation of reference method for assessment of meat color. In: Proceedings of 41st Annual International Congress of Meat Science and Technology. vol.2; 1995; San Antonio, TX p. 410-1.
25. AOAC [Association of Official Analytical Chemists] International. Official methods of analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg, MD; AOAC International; 2000.
26. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959;37:911-7. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
27. Li Y, Watkins BA. Analysis of fatty acids in food lipids. *Curr Protoc Food Anal Chem.* 2001(1):D1. 2.1-15. <https://doi.org/10.1002/0471142913.fad0102s00>
28. Gessner DK, Ringseis R, Eder K. Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2017;101:605-28. <https://doi.org/10.1111/jpn.12579>
29. Valenzuela-Grimalva N, Jiménez-Estrada I, Mariscal-Tovar S, López-García K, Pinelli-Saavedra A, Peña-Ramos EA, et al. Effects of ferulic acid supplementation on growth performance, carcass traits and histochemical characteristics of muscle fibers in finishing pigs. *Animals.* 2021;11:2455. <https://doi.org/10.3390/ani11082455>
30. Peña-Torres EF, Castillo-Salas C, Jiménez-Estrada I, Muhlía-Almazán A, Peña-Ramos EA, Pinelli-Saavedra A, et al. Growth performance, carcass traits, muscle fiber characteristics and skeletal muscle mRNA abundance in hair lambs supplemented with ferulic acid. *J Anim Sci Technol.* 2022;64:52-69. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e3>

31. Patra AK, Saxena J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009;96:363-75. <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9364-1>
32. Wang Y, Meng Z, Guo J, Wang W, Duan Y, Hao X, et al. Effect of wheat bran feruloyl oligosaccharides on the performance, blood metabolites, antioxidant status and rumen fermentation of lambs. *Small Rumin Res*. 2019;175:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.04.006>
33. Domínguez-Viveros J, Canul-Santos E, Rodríguez-Almeida FA, Burrola-Barraza ME, Ortega-Gutiérrez JÁ, Castillo-Rangel F. Defining growth curves with nonlinear models in seven sheep breeds in Mexico. *Rev Mex Cienc Pecu*. 2019;10:664-75. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i3.4804>
34. Herrera RH, Castillo MLA, Torres AJA. Methods to accelerate muscle development, decrease fat deposits, and enhance feeding efficiency in pigs. United States Patent US 201110046224A1. 2011 Feb 24.
35. Baxa TJ, Hutcheson JP, Miller MF, Brooks JC, Nichols WT, Streeter MN, et al. Additive effects of a steroidal implant and zilpaterol hydrochloride on feedlot performance, carcass characteristics, and skeletal muscle messenger ribonucleic acid abundance in finishing steers. *J Anim Sci*. 2010;88:330-7. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1797>
36. Sato S, Shirato K, Tachiyashiki K, Imaizumi K. Muscle plasticity and  $\beta$ 2-adrenergic receptors: adaptive responses of  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:729598. <https://doi.org/10.1155/2011/729598>
37. Ekpe ED, Moibi JA, Christopherson RJ. Beta-adrenergic receptors in skeletal muscles of ruminants: effects of temperature and feed intake. *Can J Anim Sci*. 2000;80:79-86. <https://doi.org/10.4141/A99-027>
38. Thompson JR, Christopherson RJ, Hammond VA, Hills GA. Effects of acute cold exposure on plasma concentrations of noradrenaline and adrenaline in sheep. *Can J Anim Sci*. 1978;58:23-8. <https://doi.org/10.4141/cjas78-003>
39. Yagoubi Y, Smeti S, Ben Saïd S, Srihi H, Mekki I, Mahouachi M, et al. Carcass traits and meat quality of fat-tailed lambs fed rosemary residues as a part of concentrate. *Animals*. 2021;11:655. <https://doi.org/10.3390/ani11030655>
40. Deligiannis K, Lainas T, Arsenos G, Papadopoulos E, Fortomaris P, Kufidis D, et al. The effect of feeding clinoptilolite on food intake and performance of growing lambs infected or not with gastrointestinal nematodes. *Livest Prod Sci*. 2005;96:195-203. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.011>
41. Abdelrahman MM, Alhidary I, Adeniji YA, Alobre MM, Albaadani H, Aljumaah R. Manipulating phosphorus, calcium, and magnesium utilization by growing lambs using natural zeolite (clinoptilolite). *Sustainability*. 2021;13:1539. <https://doi.org/10.3390/su13031539>
42. Pond WG, Laurent SM, Orloff HD. Effect of dietary clinoptilolite or zeolite Na-A on body weight gain and feed utilization of growing lambs fed urea or intact protein as a nitrogen supplement. *Zeolites*. 1984;4:127-32. [https://doi.org/10.1016/0144-2449\(84\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0144-2449(84)90050-2)
43. Valadez-García KM, Avendaño-Reyes L, Meza-Herrera CA, Mellado M, Díaz-Molina R, González-Ríos H, et al. Ferulic acid in animal feeding: mechanisms of action, productive benefits, and future perspectives in meat production. *Food Biosci*. 2021;43:101247. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101247>
44. Goodarzi M, Nanekarani S. The effects of calcic and potassic clinoptilolite on ruminal parameters in Lori breed sheep. *APCBEE Procedia*. 2012;4:140-5. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.11.024>

45. Urias-Estrada JD, López-Soto MA, Barreras A, Aguilar-Hernández JA, González-Vizcarra VM, Estrada-Angulo A, et al. Influence of zeolite (clinoptilolite) supplementation on characteristics of digestion and ruminal fermentation of steers fed a steam-flaked corn-based finishing diet. *Anim Prod Sci*. 2017;58:1239-45. <https://doi.org/10.1071/AN16128>
46. López-Baca MÁ, Avendaño-Reyes L, Macías-Cruz U, Muhlia-Almazán A, Valenzuela-Melendres M, Peña-Ramos EA, et al. Muscle fiber morphometry and physicochemical characteristics of the Longissimus thoracis muscle of hair male lambs fed zilpaterol hydrochloride and implanted with steroids. *Meat Sci*. 2021;177:108490. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108490>
47. Dávila-Ramírez JL, Avendaño-Reyes L, Macías-Cruz U, Peña-Ramos EA, Islava-Lagarda TY, Zamorano-García L, et al. Fatty acid composition and physicochemical and sensory characteristics of meat from ewe lambs supplemented with zilpaterol hydrochloride and soybean oil. *Anim Prod Sci*. 2016;57:767-77. <https://doi.org/10.1071/AN15311>
48. Peña E, Gonzalez H, Rosales F, Jiménez I, Valenzuela M, Peña A, et al. PSII-21 fiber type characterization and meat quality of hair lambs supplemented with ferulic acid. *J Anim Sci*. 2018;96:75. <https://doi.org/10.1093/jas/sky404.166>
49. Simitzi PE, Deligeorgis SG, Bizelis JA, Dardamani A, Theodosiou I, Fegeros K. Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Sci*. 2008;79:217-23. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.005>
50. Kraljević Pavelić S, Simović Medica J, Gumbarević D, Filošević A, Pržulj N, Pavelić K. Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications in vivo. *Front Pharmacol*. 2018;9:1350. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01350>
51. Fiems LO. Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. *Ann Zootech*. 1987;36:271-90. <https://doi.org/10.1051/animres:19870305>
52. Mallek Z, Fendri I, Khannous L, Hassena AB, Traore AI, Ayadi MA, et al. Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid. *Lipids Health Dis*. 2012;11:35. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-35>
53. Garcia-Galicia IA, Arras-Acosta JA, Huerta-Jimenez M, Renteria-Monterrubio AL, Loya-Olguin JL, Carrillo-Lopez LM, et al. Natural oregano essential oil may replace antibiotics in lamb diets: effects on meat quality. *Antibiotics*. 2020;9:248. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050248>
54. Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. Board-invited review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci*. 2008;86:397-412. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0588>
55. Rana MS, Tyagi A, Hossain SA, Tyagi AK. Effect of tanniniferous Terminalia chebula extract on rumen biohydrogenation,  $\Delta 9$ -desaturase activity, CLA content and fatty acid composition in longissimus dorsi muscle of kids. *Meat Sci*. 2012;90:558-63. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.09.016>
56. Great Britain Cardiovascular Review Group, Great Britain Department of Health. Nutritional aspects of cardiovascular disease: review Group Committee on Medical Aspects of Food Policy. London: H.M. Stationery Office; 1994.
57. de Evan T, Cabezas A, de la Fuente Vázquez J, Carro MD. Feeding agro-industrial by-products to light lambs: influence on meat characteristics, lipid oxidation, and fatty acid profile. *Animals*. 2020;10:1572. <https://doi.org/10.3390/ani10040600>

#### 4. CLINOPTILOLITE AND FERULIC ACID EFFECTS ON *In vitro* RUMINAL FERMENTATION

Manuscrito en preparación para su envío al journal: Fermentation MDPI  
(En revisión interna).

Ana Tánori-Lozano<sup>1</sup>, M. Ángeles López-Baca<sup>2</sup>, Maricela Montalvo-Corral<sup>1</sup>, José Luis Dávila-Ramírez<sup>1</sup>, Martín Valenzuela-Melendres<sup>1</sup>, Araceli Pinelli-Saavedra<sup>1</sup>, Thalia Y. Islava-Lagarda<sup>1</sup> and Humberto González-Rios<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán # 46. Colonia La Victoria. Box 83304, Hermosillo Sonora, México; [ana.tanori.dc19@estudiantes.ciad.mx](mailto:ana.tanori.dc19@estudiantes.ciad.mx) (A.T.-L.); [maricela.montalvo@ciad.mx](mailto:maricela.montalvo@ciad.mx) (M.M.-C.); [pinelli@ciad.mx](mailto:pinelli@ciad.mx) (A.P.-S.); [martin@ciad.mx](mailto:martin@ciad.mx) (M.V.-M.); [tislava@ciad.mx](mailto:tislava@ciad.mx) (T.Y.I.-L); [jose.davila@ciad.mx](mailto:jose.davila@ciad.mx) (J.L.D.R.); [hugory@ciad.mx](mailto:hugory@ciad.mx), (H. G.-R.)

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Ciencias Agrícolas, Valle de Mexicali, Baja California 21705, México; [maria.lopez.baca@uabc.edu.mx](mailto:maria.lopez.baca@uabc.edu.mx) (M.A.L.-B.)

\*Correspondence: [hugory@ciad.mx](mailto:hugory@ciad.mx), (H. G.-R.), phone: +52 6622892400 Ext. 600.

## ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of clinoptilolite (CTL) and ferulic acid (FA) inclusion on *in vitro* ruminal fermentation characteristics and gas production. Treatments were assigned under a 2<sup>2</sup> factorial (FA: 0 or 300 ppm; CTL: 0 or 1 %), with repeated measures on time (2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, and 72 h). As expected, CTL and FA x CTL interaction maintained ruminal pH values closest to neutral throughout the incubation period ( $p \leq 0.05$ ). After 48 and 72 h, FA and CTL decreased ( $p \leq 0.05$ ) ammonia concentrations. Acetate, propionate, and total volatile fatty acids concentrations increased ( $p \leq 0.05$ ) due to FA, CTL, and FA x CTL interaction at 48 h, while at 72 h, these concentrations were higher only for main factors. Methane, butyrate, and iso-VFA concentrations were not affected ( $p > 0.05$ ) by any treatment. FA increased total gas production throughout the entire experimental period ( $p \leq 0.05$ ). The findings of this study suggested that both additives can positively modify ruminal fermentation patterns *in vitro*, which appears to be a promising strategy in ruminant nutrition.

**Keywords:** zeolite; phytochemical; rumen fermentation; fermentation parameters.

## 1. INTRODUCTION

Phytochemicals (PCH) promise to become a strategic additive in animal production due to their potential as an alternative to synthetic growth promoters. PCH are secondary bioactive metabolites present in plants or vegetable extracts that enhance livestock growth performance and health, in addition, might mitigate methane (CH<sub>4</sub>) emission from ruminants' production [1]. Recent studies have been led to modulate ruminal fermentation (RF) parameters aiming to reduce methanogenesis and improve nutrient utilization using different PCH [2]. In this regard, ferulic acid (FA) is a phenolic compound with bioactive properties that have shown high antioxidant activity and effectiveness on animal growth performance [3]. However, it has also been suggested that phenolic compounds may change nutrient utilization, inhibit fiber digestion, and decrease feed intake [4].

Furthermore, these compounds could act as antimicrobial agents against ruminal bacteria. A previous study on *in vitro* culture of ruminal microorganism, reported that FA retarded the growth rates of cellulolytic and hemicellulolytic bacteria, and depressed cellulose digestion [5]; Hence, a high source of PCH may be considered as a RF suppressor.

Zeolites such as clinoptilolite (CTL) are mineral feed additives known for their ion exchange and adsorption properties'. Due to these abilities, CTL could lead to enhance animal performance and fermentation efficiency. Some studies have reported that CTL improve nitrogen utilization, increases volatile fatty acids (VFA) production, enhances the acetate to propionate ratio (A:P), and stabilizes rumen pH even in high-energy diets [6-8]. Moreover, Ghoneem *et al.* [6] and Goodarzi and Nanekarani [7] found an increase in the whole cellulolytic bacteria population and fiber digestibility in CTL-supplemented lambs. According to those mentioned above, we hypothesized that CTL could potentiate and modulate phenolic compounds activities reducing the side effects resulting from feeding in ruminants; besides, there is a lack of information available about the effect alone or combined of CTL and FA *in vitro* fermentation dynamics. Therefore, the present research aimed to evaluate CTL and FA effects on *in vitro* RF characteristics.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Sample and Ruminal Inoculum Preparation

A total mixed ration (TMR) was prepared according to the basal diet used in our previous study [9]. Subsequently, samples were oven dried (60 °C for 24 h) and ground through a 1 mm mesh and finally used as substrate for the *in vitro* incubations.

Total rumen contents were collected at a slaughterhouse from three male hair-breed lambs (5 months old) previously being fed with a TMR which included alfalfa hay 10 %, wheat straw 15 %, wheat grain 62 %, soybean meal 11%, and mineral/vitamin premix 2 %. The lambs were slaughtered for commercial purposes in the Institute of Agricultural Science-UABC slaughterhouse. To obtain ruminal inoculum used in the experiment, total rumen contents were

pooled and strained through a four-layered cheesecloth, then the strained ruminal fluid was buffered using a buffer solution as described by McDougall [10] at a 1:2 ratio. After the pH of the buffered ruminal fluid was regulated to 6.8 with 1 N HCl solution. The ruminal inoculum was kept in 39 °C water-bath, continuous flushing of CO<sub>2</sub>, and constantly shaken throughout it was used.

## 2.2. Ruminal Fermentation Characteristics

### 2.2.1 Experimental Design and *In Vitro* Incubation

To evaluate the effect of FA and CTL on fermentation characteristics and feed degradability, an *in vitro* ruminal fermentation experiment was carried out using 60 mL syringes fitted with plungers according to the guidelines described by Menke and Steingass [11], within 2<sup>2</sup> factorial arrangement: FA (0 or 300 ppm) and CTL (0 or 1 %). Thus, treatments combinations were: a) Control (TMR basal diet), b) FA (only FA), c) CTL (only CTL), and d) FAZ (with FA and CTL). Syringes were filled with 30 mL of ruminal inoculum and each experimental diet were added in 200 mg for each incubation time. Then, syringes were placed at 39 °C in water bath. Gas production was recorded at 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, and 72 h during the *in vitro* fermentation period, and finally incubations were stopped at either 12, 24, 48 or 72 h to measure RF. Duplicate syringes were used for each sampling and incubations were repeated two times over two consecutive weeks; also, two blanks (only ruminal inoculum) were placed in each experimental replicate.

### 2.2.2 Sampling and Chemical Analysis

Cumulative gas produced (mL) at each stage was recorded before incubation was stopped by reading the position of the piston [12]. In brief, all pistons were placed at an initial position and before piston reach the top, syringe was purged (without breaking the anaerobiosis) and placed

again at the initial position. The content of each syringe was collected in a 50 mL polypropylene tube and pH was immediately measured using a portable pH meter (Waterproof pHTestr 10, Eutech instruments). Samples were immersed into liquid nitrogen and stored at -20 °C until analysis. Total gas production was expressed as mL/g of dry matter of the substrate incubated and corrected for blanks.

Frozen samples were thawed at 4 °C overnight, and centrifuged at 14,000 x g for 10 min. The supernatant was used to measure ammonia-N (NH<sub>3</sub>-N) and volatile fatty acids (VFA) concentrations. NH<sub>3</sub>-N concentration was analyzed by phenol-hypochlorite color reaction method [13] at wave length of 630 nm (spectrophotometer; Agilent Technologies, Cary 60 UV-vis). VFA concentrations were detected by gas chromatography (Hewlett Packard model 6890, Waldbronn, Germany) following the sample preparation procedure previously reported by Zhang et al. [14]. Gas chromatograph was fitted with a FID and a capillary column (0.25 mm x 60 m; 0.25 µm film thickness; Agilent J&W DB23) with the following conditions: 0.8 µL injection volume at a split ratio of 100:1 at the injection port (160 °C), initial column temperature was 80 °C for 0 min and ramp to 115 °C (hold for 3 min) at a rate of 15 °C/min, then increased at a rate of 3 °C/min to 130 °C for 0 min, and finally increased at a rate of 5 °C/min to a final temperature of 200 °C (hold for 3 min) with a total running time of 27 min. The FID was maintained at 240 °C with a flow rate of 40 mL/min of Helium. For detection of individual VFA and quantitative calibration, an external standard mix was used (Supelco Volatile Free Acid Mix, 46.975-U, Sigma-Aldrich). Additionally, a stock solution including analytical grade acetate (71251, Sigma-Aldrich), propionate (94425, Sigma-Aldrich), and butyrate (19215, Sigma-Aldrich) was prepared with an initial concentration of 100 mmol/L of each acid. Standard calibration curves were used to calculate the concentrations of each VFA. The A:P ratio was also estimated.

CH<sub>4</sub> production was calculated based on stoichiometry equations of VFA products [15]:

$$\text{CH}_4 \text{ (mmol/mol of VFA)} = 0.5a - 0.25p + 0.5b$$

Where a, p, and b are proportions (mmol/mol) of acetate, propionate, and butyrate, respectively.

### 2.3. Statistical Analysis

The *in vitro* RF variables (including pH, gas production, CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub>-N, VFAs, and A:P) were analyzed as a 2<sup>2</sup> factorial under a complete randomized design with repeated measures over time using the PROC MIXED procedure from SAS software (version 9.4). The model considered fixed effect of treatments, time of incubation, and their interaction. The model with the lowest AIC and BIC values was the most suitable model for choosing the appropriate covariance structure. Tukey-Kramer test was used to evaluate differences among means at  $p \leq 0.05$ .

## 3. RESULTS

### 3.1. *In Vitro* Ruminant Fermentation Characteristics

The changes on RF characteristics throughout the *in vitro* fermentation period are shown in Table 1. No significant FA main effect ( $p > 0.05$ ) was observed for any RF characteristics, while CTL main effect only affected ( $p = 0.03$ ) ruminal pH overall fermentation period. Moreover, the interaction FA x CTL ( $p = 0.03$ ) affected the ruminal pH overall the incubation period and in each measure time (FA x CTL x T,  $p < 0.0001$ ). The initial pH of the ruminal inoculum was 6.8 (at 0 h), and as the incubation advanced, the pH reached a minimum value of 6.3 for the control and FA treatments. During the overall incubation period or in each measure time CTL and FAZ held the highest pH compared with the rest of the treatments.

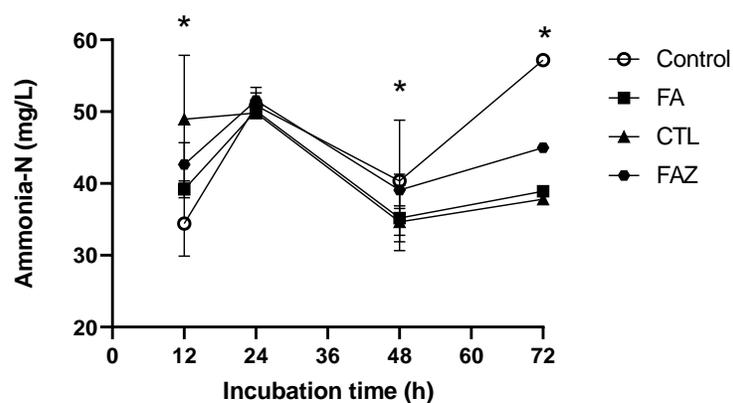
Figure 1 illustrates the significant time by FA x CTL interactions detected for NH<sub>3</sub>-N ( $p < 0.0001$ ) at each *in vitro* incubation time (12, 24, 48, and 72 h). FAZ maintained intermediate NH<sub>3</sub>-N concentrations throughout the fermentation period. Additionally, control recorded the lowest ( $p \leq 0.05$ ) NH<sub>3</sub>-N values at 12 h but reached the maximum ( $p < 0.0001$ ) concentrations at 72 h among treatments. On the contrary, at 12 h NH<sub>3</sub>-N was higher ( $p \leq 0.05$ ) for CTL, but the concentrations decreased ( $p \leq 0.05$ ) between 48 and 72 h, as did the FA addition.

**Table 1.** Effect of ferulic acid and clinoptilolite on ruminal fermentation products during the *in vitro* incubation period.

Item	Incubation Time (h)	No CTL		CTL <sup>2</sup>		SEM	p-value <sup>3</sup>			
		No FA	FA <sup>1</sup>	No FA	FA		FA	CTL	FA x CTL	FA x CTL x T
pH	12	6.4 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>	6.45 <sup>b</sup>	6.4 <sup>a</sup>					
	24	6.3 <sup>a</sup>	6.4 <sup>b</sup>	6.4 <sup>b</sup>	6.3 <sup>a</sup>	0.01	1.00	<b>0.030</b>	<b>0.030</b>	<b>&lt;.0001</b>
	48	6.4 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>	6.45 <sup>b</sup>					
	72	6.3 <sup>a</sup>	6.3 <sup>a</sup>	6.35 <sup>b</sup>	6.35 <sup>b</sup>					
NH <sub>3</sub> -N <sup>4</sup> (mg/L)	12	34.4 <sup>a</sup>	39.17 <sup>ac</sup>	48.96 <sup>b</sup>	42.65 <sup>c</sup>					
	24	50.84	50.12	49.80	51.54	1.84	0.169	0.707	<b>0.008</b>	<b>&lt;.0001</b>
	48	40.34 <sup>a</sup>	35.19 <sup>ab</sup>	34.66 <sup>b</sup>	39.07 <sup>ab</sup>					
	72	57.19 <sup>a</sup>	38.92 <sup>b</sup>	37.81 <sup>b</sup>	44.97 <sup>c</sup>					
CH <sub>4</sub> <sup>5</sup> (moles/mol VFA)	12	22.50	22.56	22.37	22.57					
	24	26.14	25.88	25.32	25.28	1.40	0.432	0.823	0.093	0.117
	48	24.35	29.80	29.00	28.01					
	72	28.80	32.43	30.48	27.91					
VFA <sup>6</sup> (mmol/L)										
	12	43.05	43.61	42.87	43.33					
	24	49.64	49.43	48.02	48.15	2.12	0.185	0.888	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>
	48	45.12 <sup>a</sup>	56.87 <sup>b</sup>	55.50 <sup>b</sup>	53.72 <sup>b</sup>					
Propionate	72	50.57 <sup>a</sup>	61.96 <sup>b</sup>	58.39 <sup>b</sup>	48.96 <sup>a</sup>					
	12	25.89	26.55	26.08	26.25					
	24	28.60	28.95	27.84	28.18	2.10	0.517	0.879	0.100	<b>0.006</b>
	48	24.27 <sup>a</sup>	30.83 <sup>b</sup>	30.63 <sup>b</sup>	30.48 <sup>b</sup>					
Butyrate	72	25.06 <sup>a</sup>	32.95 <sup>b</sup>	31.51 <sup>b</sup>	24.11 <sup>a</sup>					
	12	14.89	14.78	14.91	14.94					
	24	16.94	16.80	16.53	16.50	1.27	0.758	0.917	0.821	0.647
	48	15.72	18.14	17.81	17.53					
Isobutyrate	72	19.56	19.37	18.32	18.91					
	12	2.86	2.81	2.70	2.75					
	24	3.59	3.55	3.60	3.57	0.17	0.886	0.962	0.402	0.862
	48	3.53	3.53	3.58	3.59					
Valerate	72	3.61	3.40	3.44	3.62					
	12	3.55 <sup>a</sup>	3.56 <sup>a</sup>	3.61 <sup>a</sup>	3.59 <sup>a</sup>	0.70	0.784	0.969	0.178	<b>0.012</b>

	24	4.31 <sup>a</sup>	4.29 <sup>a</sup>	4.15 <sup>a</sup>	4.17 <sup>a</sup>					
	48	3.84 <sup>a</sup>	5.06 <sup>a</sup>	4.93 <sup>a</sup>	4.77 <sup>a</sup>					
	72	3.56 <sup>a</sup>	5.96 <sup>b</sup>	5.67 <sup>b</sup>	3.41 <sup>a</sup>					
	12	2.55	2.55	2.56	2.55					
Isovalerate	24	3.77	3.74	3.66	3.44	0.12	0.547	0.778	0.123	0.124
	48	3.43	3.84	4.00	3.66					
	72	4.02	3.99	4.00	3.83					
	12	91.66 <sup>a</sup>	92.76 <sup>a</sup>	91.71 <sup>a</sup>	92.34 <sup>a</sup>					
Total VFA	24	105.64 <sup>a</sup>	105.56 <sup>a</sup>	102.51 <sup>a</sup>	102.75 <sup>a</sup>	4.11	0.229	0.996	<b>0.005</b>	<b>0.0009</b>
	48	94.47 <sup>a</sup>	117.33 <sup>b</sup>	115.44 <sup>b</sup>	112.69 <sup>b</sup>					
	72	105.17 <sup>a</sup>	126.92 <sup>b</sup>	120.47 <sup>b</sup>	101.52 <sup>a</sup>					
	12	0.92	0.90	0.91	0.91					
A:P <sup>7</sup>	24	0.94	0.92	0.94	0.93	0.11	0.927	0.862	0.766	0.594
	48	1.04	1.01	1.00	0.97					
	72	1.13	1.03	1.02	1.15					

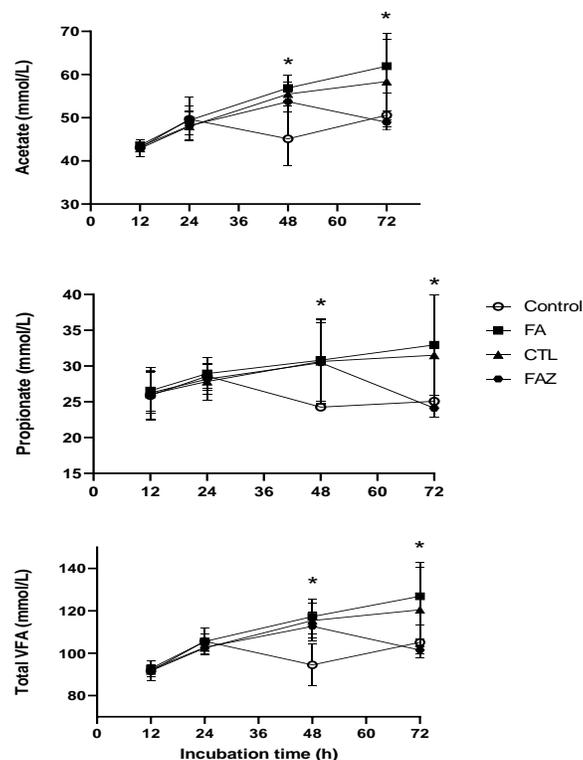
<sup>a-c</sup> Means within a row with different letters differ at  $p \leq 0.05$ ; <sup>1</sup>Ferulic acid dose level of 300 ppm; <sup>2</sup>Clinoptilolite dose level of 1 %; <sup>3</sup>FA: Main effect of ferulic acid, CTL: Main effect of clinoptilolite, FA x CTL: Interaction effect of FA and CTL, FA x CTL x T: Interaction effect of FA x CTL through incubation period; <sup>4</sup>NH<sub>3</sub>-N: Ammonia nitrogen; <sup>5</sup>CH<sub>4</sub>: Methane; <sup>6</sup>VFA: Volatile fatty acids; <sup>7</sup>A:P: Acetate to propionate ratio.



**Figure 1.** Effect of ferulic acid (FA) and clinoptilolite (CTL) on NH<sub>3</sub>-N concentrations (mg/L) throughout the *in vitro* incubation period. \* Indicate significant differences at  $p \leq 0.05$ .

The CH<sub>4</sub> production was not affected irrespective of treatments and interactions ( $p > 0.05$ ). The

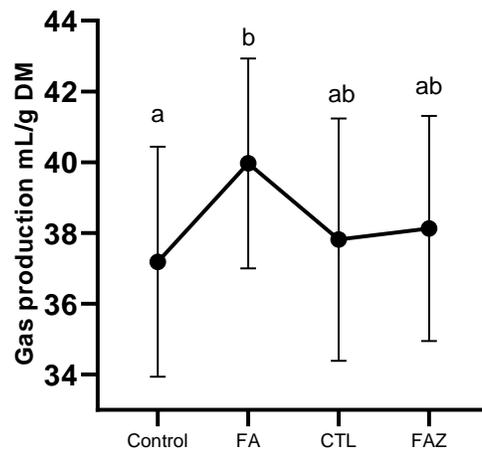
CH<sub>4</sub> concentrations were between 22.5 and 29.9 moles/mol VFA at 12 h and 72 h, respectively (Table 1). Regarding to the VFA production, butyrate, isobutyrate, isovalerate, and the A:P ratio were not changed by either main factors or their interaction ( $p > 0.05$ ). Meanwhile, the total VFA production ( $p = 0.0009$ ), acetate ( $p = 0.002$ ), propionate ( $p = 0.006$ ), and valerate ( $p = 0.012$ ) concentrations were modified by FA x CTL interaction only on 48 h and 72 h of the *in vitro* fermentation period (Figure 2). Acetate and total VFA concentrations increased due to FA (~ 25 %), CTL (~ 23 %), and FAZ (~ 19 %) inclusion at 48 h, while, at 72 h the concentrations only increased by about 21 and 15 % due to main factors. Moreover, acetate concentrations were lower ( $p \leq 0.05$ ) by 20 % at 72 h for the interaction FA x CTL than with FA or CTL main factors. Additionally, propionate concentrations were higher with FA and CTL alone and combine at 48 h. However, this increase in propionate and valerate concentrations was only observed for the main effects at 72 h.



**Figure 2.** Effect of ferulic acid (FA) and clinoptilolite (CTL) on acetate, propionate, and total VFA concentrations (mmol/L) during the *in vitro* fermentation trial. FA x CTL x T was significant ( $p \leq 0.05$ ). \* Indicate significant differences at  $p \leq 0.05$  in each incubation period.

Effects of FA and CTL on total gas production of the *in vitro* fermentation period are shown in

Figure 3. The gas production was not affected by time ( $p > 0.05$ ) in each incubation period. An effect of FA ( $p = 0.014$ ) and FA x CTL interaction ( $p = 0.040$ ) was observed for total gas production throughout fermentation period. FA increased ( $p < 0.0001$ ) total gas production compared to the other treatments.



**Figure 3.** Effect of ferulic acid (FA) and clinoptilolite (CTL) on *in vitro* total gas production (mL). Gas production was not affected by incubation time ( $p > 0.05$ ). FA ( $p = 0.014$ ) main effect on total gas production was significant. Means with different letters, indicate significant differences at  $p \leq 0.05$ .

#### 4. DISCUSSION

Nowadays, few studies have been published reporting the effects of CTL on *in vitro* ruminal fermentation (RF) characteristics, to our knowledge, there is a lack of studies reporting the changes in RF characteristics by FA addition, despite knowing that phenolic compounds and zeolites can modulate RF parameters [6, 16-18].

Phenolic compounds might act as defaunating agents in the rumen, by altering some bacteria and

protozoa growth rate and metabolism [5]. Otherwise, studies have been reported the potential of using CTL as a rumen modifier and thereby enhance nutrient digestibility and propionate molar proportions. Moreover, in studies with ruminants, CTL supplementation can regulate ruminal pH and N-NH<sub>3</sub> concentrations [7, 8, 18, 19].

Higher *in vitro* ruminal pH values were observed in response to CTL alone and FA x CTL interaction throughout incubation period. Several authors have indicated that CTL acts as a buffering agent, which is attributed to the capacity of this mineral to exchange H<sup>+</sup> ions for its constituent ions [20, 21]. It is worth mentioning that pH values closer to neutral are associated with higher growth rates and microbial protein synthesis. Therefore, the results obtained in this study regarding the inclusion of CTL in the *in vitro* pH were expected and suggest that CTL can protect rumen environment from pH fluctuations, thus mitigating metabolic disorders observed in finishing diets, (especially during the first hour's post-feeding), and, can provide optimal conditions for microbial activity.

The reduction of N-NH<sub>3</sub> after 48 h of incubation by the effect of CTL and FA could be the consequence of a modification in protein metabolism or an alteration in rumen bacteria composition/activity. Furthermore, this decrease in N-NH<sub>3</sub> concentrations may be associated with CTL properties: ion-exchange property of CTL allows this mineral to remove ammonium ions and then release them during rumination, for efficient assimilation by rumen microorganisms [6, 8, 22-24]. It is well known that N-NH<sub>3</sub>, iso-butyrate, and iso-valerate production are related to rumen nitrogen metabolism (proteolysis, peptidolysis, and deamination; [25]). There is evidence that essential oils and phenolic compounds lower the rate of protein degradation by forming reversible complexes with proteins or by inhibiting proteolytic or hyper-ammonia producing bacteria such as *Butyrivibrio sp.*, *Streptococcus bovis*, or *Selenomonas ruminantium*. Although, *Prevotella sp.* and *Selenomonas ruminantium* are known to use ammonia for amino acids synthesis [24, 25]. In this regard, Zhang *et al.* [22] reported a reduction in N-NH<sub>3</sub> concentrations by including grape pomace and a feruloyl esterase-producing bacteria. Authors associated N-NH<sub>3</sub> concentrations reduction was due to the increase bypass protein and improved nitrogen uptake by rumen bacteria. However, in this study, FA did not alter iso-VFA molar proportions. Thereby it is suggested that FA has a low effect on protein degradation compared with high molecular weight phenolic compounds.

Gas methane production has a non-significant reduction within treatments. Although methanogens and protozoa populations were not measured in the current study, a decreased in methane and N-

NH<sub>3</sub> concentrations in the rumen positively correlate with reduced protozoa and methanogen counts [2]. Furthermore, CTL could act as a temporary reservoir of H<sup>+</sup> and, consequently, can temporarily reduce its availability in the rumen. This could lead to a lower prevalence of methanogens in the rumen, due to the slow growth rate and hydrogen preference as an energy source [25, 26].

Even though methanogenesis is the largest reservoir of H<sup>+</sup> in the rumen, there are alternative pathways for incorporating H<sup>+</sup> into other RF end-products, such as propionate production or reductive acetogenesis [26, 27]. In the present study, FA x CTL increased propionate and acetate production after 48 h of incubation. Moreover, after 72 h of fermentation only FA and CTL increased acetate and propionate proportions. These changes were reflected in the sum of the total VFA concentrations; however, they were not reflected in the A:P ratio. According to our findings, we suggest that the increased acetate production is leading to higher propionate production, as a higher acetate production is associated with more H<sup>+</sup>, thereby both additives are potentially inhibiting methanogens growth and redirecting H<sup>+</sup> to propionate synthesis [2, 27]. Another notable change in the VFA profile was an increase in valerate production because of FA and CTL at 72 h of incubation. In normal conditions, low valerate concentrations are produced in the rumen, thus an increase in the abundance of *Megasphaera elsdenii* could help to explain why we found higher valerate production. *Megasphaera elsdenii* is a bacteria known to produce valerate and propionate from lactate [28]. The effects of FA and CTL on VFA profile can be attributed to a slight modification in rumen microbiome either directly or indirectly. Based on the properties of FA and CTL, both additives act differently to modulate the rumen environment. Regarding phenolic compounds, due to their functional group or lipophilic nature, these compounds have antimicrobial activity. They can interact with the microbial cell membrane, which inhibits the growth of rumen microorganisms [1, 2]. On the other hand, the effect of CTL to modulate the rumen environment is related to its cation exchange property and its buffering effect in the rumen [18, 21]. Slight modifications in rumen pH can create optimal conditions to stimulate specific certain rumen microbial populations.

Gas production during *in vitro* fermentation is highly correlated to carbohydrate fermentation, and the amount of gas produced, reflects VFA production (mainly acetate and butyrate); hence, it may supply valuable information to predict animal performance and feed utilization [29]. Results of the higher gas production in response to FA supplementation suggest that FA positively affect the grade and rate of the *in vitro* feed degradability, likely due to an enhancement of microbial activity

of some bacteria communities [30, 31]. However, the results of studies examining the effects of phenolic compounds or essential oils on gas production have been conflicting. Some studies have suggested that phenolic compounds might enhance feed degradability throughout fermentation period due to a reduction of rumen oxidative stress or the inhibition of some bacteria growth [31-33]. On the other hand, some authors reported a depressant effect in RF characteristics by including a considerable number of phenolic compounds in the diet. In this regard, changes in RF characteristics in response to phenolic compounds may be dose dependent. In our study, it was observed that gas production increases throughout the incubation period in response to the addition of FA. Similarly, after 48 h, FA increased the VFA total production and acetate. Our findings suggest that FA could cause a favorable change in microbial activity towards a higher intensity and digestibility rate. However, data on feed degradability and microbial composition are required to confirm and associate these hypothesis that warrants further studies.

## 5. CONCLUSIONS

This study provides new data that will help to elucidate the action mode and effects of ferulic acid and clinoptilolite on rumen fermentation characteristics. The combined use of ferulic acid and clinoptilolite had the potential to positively modulate *in vitro* rumen fermentation, which may benefit animal production. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to optimize the dose and time exposure of both additives to fully understand the changes in ruminal fermentation parameters so that animal productive efficiency can be achieved. Additionally, metagenomic studies are required to determine the changes in the whole rumen microbiome composition and analyze biological functions or interactions of ferulic acid and clinoptilolite supplementation.

**Author Contributions:** Conceptualization: González-Rios H. Data curation: Tánori-Lozano A, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela-Melendres M, López-Baca MA. Formal analysis: Tánori-Lozano A, López-Baca MA, Dávila-Ramírez JL. Methodology: Tánori-Lozano A, López-Baca MA, Montalvo-Corral M, Valenzuela-Melendres M, Islava-Lagarda TY, González-Rios H.

Investigation: Tánori-Lozano A, López-Baca MA, Pinelli-Saavedra A, Islava-Lagarda TY, González-Rios H. Writing - original draft: Tánori-Lozano A, Dávila-Ramírez JL, González-Rios H. Writing - review & editing: Tánori-Lozano A, López-Baca MA, Montalvo-Corral M, Pinelli-Saavedra A, Valenzuela-Melendres M, Dávila-Ramírez JL, Islava-Lagarda TY, González-Rios H.

**Funding:** The current research was supported by the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C, the Institute of Agricultural Science (ICA-UABC), and Conahcyt (Mexico Government) awarded a postgraduate scholarship to the first author.

**Institutional Review Board Statement:** For this research no ethical approval or review was needed because rumen content was taken of *post-mortem* animals only. Slaughter of lambs was carried out according to the official guidelines for animal care and slaughter in México.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge the support and facilities provided in the field phase (ICA-UABC) by Dr. Ulises Macías, Germán Castillo, María Cisneros, and Dra. Marisol Galicia. We also appreciate the help provided in the laboratory by Julio González, Nallely Peñuñuri, and Leslie Medrano.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

## REFERENCES

1. Kuralkar, P. and S. Kuralkar, *Role of herbal products in animal production—An updated review*. Journal of Ethnopharmacology, 2021. **278**: p. 114246.
2. Kholif, A.E. and O.A. Olafadehan, *Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance*. Phytochemistry Reviews, 2021. **20**(6): p. 1087-1108.
3. Valadez-García, K.M., et al., *Ferulic acid in animal feeding: mechanisms of action, productive benefits, and future perspectives in meat production*. Food Bioscience, 2021. **43**: p. 101247.
4. Cao, B.B., et al., *Microbial release of ferulic and p - coumaric acids from forages and their digestibility in lactating cows fed total mixed rations with different forage combinations*. Journal

of the Science of Food and Agriculture, 2016. **96**(2): p. 650-655.

5. Chesson, A., C.S. Stewart, and R.J. Wallace, *Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1982. **44**(3): p. 597-603.

6. Ghoneem, W.M.A., R.R. El-Tanany, and A.E.M. Mahmoud, *Effect of Natural Zeolite as a Rumen Buffer on Growth Performance and Nitrogen Utilization of Barki Lambs*. Pakistan J. Zool, 2022. **54**(3): p. 1199-1207.

7. Goodarzi, M. and S. Nanekarani, *The effects of calcic and potassic clinoptilolite on ruminal parameters in Lori breed sheep*. APCBEE Procedia, 2012. **4**: p. 140-145.

8. Roque-Jiménez, J., et al., *Effect of natural zeolite on live weight changes, ruminal fermentation and nitrogen metabolism of ewe lambs*. South African Journal of Animal Science, 2018. **48**(6).

9. Tánori-Lozano, A., et al., *Influence of ferulic acid and clinoptilolite supplementation on growth performance, carcass, meat quality, and fatty acid profile of finished lambs*. Journal of Animal Science and Technology, 2022. **64**(2): p. 274-290.

10. McDougall, E.I., *Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva*. Biochemical journal, 1948. **43**(1): p. 99.

11. Menke, K.H., et al., *The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro*. The Journal of Agricultural Science, 1979. **93**(1): p. 217-222.

12. Fleming, A., et al., *In vitro fermentation of fodder beet root increases cumulative gas production of methane and carbon dioxide*. Livestock Science, 2020. **241**: p. 104225.

13. Weatherburn, M., *Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia*. Analytical chemistry, 1967. **39**(8): p. 971-974.

14. Zhang, Z., et al., *Convergent evolution of rumen microbiomes in high-altitude mammals*. Current Biology, 2016. **26**(14): p. 1873-1879.

15. Wolin, M.J., *A theoretical rumen fermentation balance*. Journal of Dairy Science, 1960. **43**(10): p. 1452-1459.

16. Menci, R., et al., *Effects of two tannin extracts at different doses in interaction with a green or dry forage substrate on in vitro rumen fermentation and biohydrogenation*. Animal Feed Science and Technology, 2021. **278**: p. 114977.

17. Nowak, B., et al., *Effect of Paulownia leaves extract levels on in vitro Ruminant fermentation, microbial population, methane production, and fatty acid biohydrogenation*. *Molecules*, 2022. **27**(13): p. 4288.
18. McCollum, F.T. and M.L. Galyean, *Effects of clinoptilolite on rumen fermentation, digestion and feedlot performance in beef steers fed high concentrate diets*. *Journal of Animal Science*, 1983. **56**(3): p. 517-524.
19. Sallam, S.M., et al., *Nutrient intake, digestibility, growth performance, and carcass of sheep fed urea - based diet supplemented with natural clinoptilolite*. *Animal Science Journal*, 2022. **93**(1): p. e13689.
20. Amanzougarene, Z. and M. Fondevila, *Rumen Fermentation of Feed Mixtures Supplemented with Clay Minerals in a Semicontinuous In Vitro System*. *Animals*, 2022. **12**(3): p. 345.
21. White, J.L. and A.J. Ohlrogge, *Ion exchange materials to increase consumption of non-protein nitrogen by ruminants*. 1983, Google Patents.
22. Zhang, X., et al., *Microbial mechanisms of using feruloyl esterase-producing *Lactobacillus plantarum* A1 and grape pomace to improve fermentation quality and mitigate ruminal methane emission of ensiled alfalfa for cleaner animal production*. *Journal of Environmental Management*, 2022. **308**: p. 114637.
23. Ebeid, H.M., et al., *Moringa oleifera oil modulates rumen microflora to mediate in vitro fermentation kinetics and methanogenesis in total mix rations*. *Current microbiology*, 2020. **77**: p. 1271-1282.
24. Zhou, R., et al., *Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community*. *Journal of dairy science*, 2020. **103**(3): p. 2303-2314.
25. Hartinger, T., N. Gresner, and K.-H. Südekum, *Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation*. *Journal of animal science and biotechnology*, 2018. **9**: p. 1-21.
26. El-Nile, A., et al., *In vitro and in vivo assessment of dietary supplementation of both natural or nano-zeolite in goat diets: Effects on ruminal fermentation and nutrients digestibility*. *Animals*, 2021. **11**(8): p. 2215.
27. Beauchemin, K.A., et al., *Fifty years of research on rumen methanogenesis: Lessons*

*learned and future challenges for mitigation. Animal*, 2020. **14**(S1): p. s2-s16.

28. Weimer, P. and M. Digman, *Fermentation of alfalfa wet-fractionation liquids to volatile fatty acids by Streptococcus bovis and Megasphaera elsdenii*. *Bioresource technology*, 2013. **142**: p. 88-94.

29. Getachew, G., et al., *Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds*. *Animal feed science and technology*, 2004. **111**(1-4): p. 57-71.

30. Jin, L., et al., *Impact of ferulic acid esterase - producing lactobacilli and fibrolytic enzymes on ensiling and digestion kinetics of mixed small - grain silage*. *Grass and Forage Science*, 2017. **72**(1): p. 80-92.

31. Min, B., et al., *The effect of phytochemical tannins-containing diet on rumen fermentation characteristics and microbial diversity dynamics in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing*. *Agric Food Anal Bacteriol*, 2014. **4**(195-211): p. 141909.

32. Barakat, A.Z., et al., *Date palm and saw palmetto seeds functional properties: Antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activities*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020. **14**: p. 1064-1072.

33. Soltan, Y., et al., *Comparative effects of Moringa oleifera root bark and monensin supplementations on ruminal fermentation, nutrient digestibility and growth performance of growing lambs*. *Animal Feed Science and Technology*, 2018. **235**: p. 189-201.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con respecto a las variables productivas, los resultados mostraron que la interacción AF x CTL no tuvo efecto ( $P > 0.05$ ) sobre el comportamiento productivo, características de la canal ni en el rendimiento de cortes primarios en los corderos. En cuanto a los efectos de los factores principales, se observó que los corderos suplementados con AF disminuyeron ( $P = 0.039$ ) un 7 % su consumo de alimento solamente durante el segundo período de alimentación (d 21 al 40), sin embargo, esta reducción no se vio reflejada en la eficiencia alimenticia ( $P > 0.05$ ). Por otra parte, los corderos suplementados con CTL tendieron a aumentar alrededor de 7.5 % su consumo de alimento durante el primero (d 0 al 20;  $P = 0.088$ ) y segundo período experimental (d 21 al 40;  $P = 0.054$ ), donde en este último la eficiencia alimenticia tendió a ser mayor ( $P = 0.065$ ). Ninguno de los cambios antes mencionados se mostró en el período completo de alimentación (d 0 a al 40;  $P > 0.05$ ). Finalmente, ni el peso vivo final ni las ganancias diarias de peso fueron modificadas ni por la interacción ni por los factores principales ( $P > 0.05$ ).

La falta de efecto en las variables productivas estuvo de acuerdo con los resultados reportados por Macías-Cruz *et al.*, (2014), Valadez-García *et al.*, (2021) y Nicolás-López *et al.*, (2022), donde se suplementó a corderas con dosis similares de AF (250 ppm y 300 ppm). Contrariamente, Peña-Torres *et al.*, (2022) si encontraron una mejora en las GDP de los corderos suplementados con este compuesto fenólico, sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, los corderos utilizados eran más jóvenes y livianos. Por lo tanto, para brindar una posible explicación de estas diferencias encontradas entre estudios, se propone que este efecto promotor de crecimiento solamente se presente en animales livianos y juveniles, que suele ser el período en el que el potencial de desarrollo es lineal, mientras que la tasa de crecimiento es más estable en las etapas donde los animales se encuentran cerca de su peso adulto, por lo que es difícil que se presenten cambios en el crecimiento de los animales (Domínguez-Viveros *et al.*, 2019).

Es importante resaltar que en otros trabajos, AF ha demostrado un efecto promotor del crecimiento en otras especies como bovinos y cerdos (González-Rios *et al.*, 2013; Peña-Torres *et al.*, 2021; Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2021), en los cuales se ha sugerido que el AF se puede comportar como un promotor de crecimiento de tipo AA- $\beta_2$  debido a la similitud estructural entre ambas moléculas. Vale la pena mencionar que los receptores adrenérgicos- $\beta_2$  son predominantes en el músculo

esquelético de bovinos y cerdos (Thompson *et al.*, 1978; Epke *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2011). Estas observaciones sugieren que, en cerdos y bovinos, el AF estimula a los receptores adrenérgicos- $\beta_2$  para promover un efecto de crecimiento, mientras que, en los corderos, AF se comporta de manera diferente. Por lo cual, se requiere de más investigación sobre la expresión génica de los receptores adrenérgicos-  $\beta$  o la evaluación de la afinidad de unión al receptor adrenérgico- $\beta$  para dilucidar estas inconsistencias entre especies.

La disminución en el consumo de alimento por efecto de AF, observado únicamente durante el segundo período de la prueba de alimentación (d 21 al 40), podría deberse a que la suplementación prolongada de este fitoquímico ocasiona cambios favorables en el microbioma ruminal, dirigiendo el proceso de FR hacia un uso más eficiente de la energía y nutrientes, y consecuentemente, hacia un mayor rendimiento (Hassan *et al.*, 2020; Kholif & Olafadehan, 2021).

Por otra parte, se ha documentado que CTL mejora las ganancias de peso de los animales suplementados con dosis mayores al 1 % o cuando las dietas son altas en proteínas (Pond *et al.*, 1984; Toprak *et al.*, 2016). Lo anterior podría deberse a que una ingesta alta de proteína eleva las concentraciones de nitrógeno y amoníaco ruminal. Dada la alta afinidad de la zeolita con los iones de amonio, estos quedarían retenidos en la matriz del mineral y liberados más tarde durante la rumia, donde se intercambiarían por los iones de calcio o sodio provenientes de la saliva que ingresa al rumen, contribuyendo así a una mejor asimilación del nitrógeno por los microorganismos ruminales para su crecimiento y producción de proteína microbiana (White & Ohlrogge, 1983; Mumpton, 1998).

Las variables correspondientes a las características de la canal no fueron afectadas por el uso individual de cada compuesto ( $P > 0.05$ ): el rendimiento de la canal caliente y fría, espesor de grasa dorsal, área del ojo de costilla, longitud de la canal, profundidad del tórax y perímetro de la pierna. Mientras que el puntaje de la conformación de la canal se vio afectada negativamente ( $P = 0.036$ ) por el uso de AF. Por su parte, la pérdida por enfriamiento de la canal de los corderos suplementados con CTL tendió a disminuir ( $P = 0.072$ ), asimismo, la longitud de la pierna tendió a aumentar ( $P = 0.057$ ) por efecto de la zeolita. Por último, el rendimiento de cortes primarios no fue modificado por la suplementación individual o combinada de ambos aditivos ( $P > 0.05$ ).

Los resultados obtenidos de las características de la canal y rendimiento de cortes primarios sugieren que AF no tiene un efecto anabólico en los corderos pesados, tal como se muestra en corderos livianos y en otras especies (González-Rios *et al.*, 2013; Valenzuela-Grijalva *et al.*, 2021;

Peña-Torres *et al.*, 2022). Las inconsistencias entre resultados podrían deberse a que el efecto promotor del crecimiento del AF se encuentra asociado a la raza, sexo, edad, especie o condiciones ambientales. En cuanto al uso de CTL, en otros estudios, aunque las ganancias de peso mejoraron por la adición de CTL en la dieta de rumiantes, no se presentaron cambios en las características de la canal (Forouzani *et al.*, 2004; Deligiannis *et al.*, 2005; Estrada-Angulo *et al.*, 2017). Dado a que en la presente investigación la suplementación con CTL no mejoró el desarrollo muscular en los corderos, no se esperaban modificaciones en las características de la canal. De acuerdo a lo informado en la literatura, el uso de CTL solamente ha mostrado tendencias de interés (canales magras y con aumentos no significativos en el AOC) cuando los animales presentan un mejor rendimiento productivo (Coronel-Burgos *et al.*, 2017; Estrada-Angulo *et al.*, 2017).

Los resultados de los análisis correspondientes a la calidad de la carne de los corderos de pelo, realizados sobre el músculo *Longissimus thoracis* (LT), mostraron que ni el uso individual ni combinado de los aditivos ejercieron efecto ( $P > 0.05$ ) sobre el valor de pH, capacidad de retención de agua, pérdida por cocción, esfuerzo al corte, ni en la composición proximal (contenido de proteína, grasa, agua y cenizas). Sin embargo, con respecto a los parámetros de color, CTL mejoró ( $P \leq 0.05$ ) los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $C^*$ , mientras que tendió a aumentar la amarillez de la carne ( $b^*$ ,  $P = 0.070$ ).

La falta de efectos en la calidad de la carne por el uso de AF en la dieta de corderos de pelo, concuerda con los resultados de estudios previos realizados en ovinos (Peña *et al.*, 2018; Valadez-García *et al.*, 2021), sin embargo, con base a otros estudios realizados en bovinos, se esperaba que el uso de AF causara cambios favorables en la calidad de la carne (González-Rios *et al.*, 2013, 2016). Lo anterior puede deberse a que en ovinos la eficiencia de absorción de AF es reducida debido a que éste es altamente metabolizado o eliminado rápidamente del cuerpo, limitando su acumulación en los tejidos para ejercer sus propiedades (Chesson *et al.*, 1999; Manach *et al.*, 2004). Por otro lado, con relación a los efectos por la CTL, hasta nuestro conocimiento éste es el primer estudio que evalúa los efectos de la suplementación con el uso de este compuesto en la calidad de la carne de rumiantes, por lo que los resultados se compararán con estudios realizados en otras especies. En contraste a los resultados del presente estudio, Hcini *et al.*, (2018) no reportaron cambios en ninguna de los parámetros de color de la carne de pollos suplementados con zeolita. Estas modificaciones en las variables de color podrían asociarse a la capacidad antioxidante de la CTL, la cual se encuentra relacionada a la captura de especies reactivas de oxígeno y metales de

transición que pudieran demeritar el estado oxidativo del animal (Hcini *et al.*, 2018; Kraljević *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado que las zeolitas pueden regular la actividad de enzimas antioxidantes endógenas como la glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa o catalasa, por su propiedad para intercambiar oligoelementos contenidos dentro de su estructura, los cuales actúan como cofactores para la actividad de estas enzimas mencionadas (Hcini *et al.*, 2018; Kraljević *et al.*, 2018). Sin embargo, se requieren más investigaciones para demostrar los efectos de la CTL en la carne de corderos.

Ahora, en relación con el perfil de lípidos del músculo LT, solamente algunos ácidos grasos (AG; esteárico, linolelaídico y linolénico) se modificaron ( $P \leq 0.05$ ) por la interacción AF x CTL, mientras que la adición de AF no afectó ( $P > 0.05$ ) a ninguno de los AG. Como efecto principal, CTL aumentó ( $P \leq 0.05$ ) los porcentajes de los ácidos cáprico, miristoleico, y pentadecanoico, así como también disminuyó el porcentaje del ácido mirístico ( $P \leq 0.05$ ), sin modificar ( $P > 0.05$ ) ningún otro AG. Se ha observado que la actividad de la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa mejora en presencia de compuestos fenólicos (Rana *et al.*, 2012) y CTL (Mallek *et al.*, 2012), lo cual favorece la insaturación de los AGS y explica los efectos encontrados debido a la interacción. Por otra parte, en concordancia con los efectos de la zeolita, Mallek *et al.*, (2012) reportaron una disminución en los ácidos mirístico, palmítico y esteárico de la pechuga de pollos por efecto de la suplementación con CTL. Estos cambios en la composición lipídica debido al uso individual de CTL, podrían estar relacionados, por un lado, a una mayor actividad de la enzima  $\Delta 9$ -desaturasa debido a que algunos cationes intercambiables contenidos en la matriz del mineral estén actuando como cofactores para la regulación de esta enzima (Mallek *et al.*, 2012; Hcini *et al.*, 2018). Por otro lado, estos cambios podrían deberse a una modulación en el ambiente ruminal y, por ende, en las poblaciones de bacterias ruminales, especialmente en aquellas que se encuentran involucradas en el proceso de biohidrogenación ruminal (BH) (García-Galicia *et al.*, 2020). En relación con esta segunda vía de acción, está bien documentado que la CTL actúa como un agente buferizante en ambientes ácidos, lo cual podría proporcionar un ambiente ruminal ideal para la proliferación de bacterias celulolíticas. *Ruminococcus albus* y *Butyrivibrio sp.* son bacterias celulolíticas que se colocan en el primer grupo de bacterias ruminales que hidrogenan a los AG insaturados. *B. fibrisolvens* se ha utilizado para explorar las múltiples vías de BH de los AG. Estas bacterias pueden hidrogenar los ácidos linoleico y alfa-linolénico a una forma conjugada como producto final sin llegar a formar ácido esteárico (Jenkins *et al.*, 2008; García-Galicia *et al.*, 2020).

Adicionalmente, es importante mencionar que la interacción AF x CTL o el efecto principal de AF no afectaron ( $P > 0.05$ ) la sumatoria total de los AG monoinsaturados (AGMS), poliinsaturados (AGP), saturados (AGS) o los índices nutricionales, mientras que, la adición de CTL aumentó favorablemente ( $P \leq 0.05$ ) el total de AGP. Este último efecto benéfico de CTL sobre la carne de corderos no era esperado, ya que la proporción de los AGP en forma individual no variaron por el mineral. Aunque la proporción del ácido eicosaenóico se duplicó prácticamente debido a la suplementación de la zeolita, lo que podría explicar parcialmente el aumento en la disponibilidad total de AGP en la carne del músculo LT. De acuerdo con nuestros resultados, Mallek *et al.*, (2012) también observaron una mejora en la disponibilidad total de AGP en carne de pollo cuando se incluyó CTL en la dieta de las aves. Sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar el mecanismo por el cual ocurren los cambios antes descritos en el perfil lipídico de la carne de ovinos.

Con respecto a los resultados correspondientes al segundo experimento, como efecto principal, AF no causó algún efecto ( $P > 0.05$ ) sobre los parámetros de la FR. Mientras que la adición de CTL solamente afectó el pH ruminal ( $P = 0.030$ ), donde al igual que la interacción (AF x CTL;  $P = 0.030$ ), mantuvieron los valores más altos de pH a lo largo de la prueba. Además, se observó que la interacción AF x CTL x Tiempo (T) fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) para algunas variables de la FR *in vitro* (pH ruminal, N amoniacal, acetato, propionato, valerato y sumatoria total de AGV). Por un lado, las concentraciones de N amoniacal se mantuvieron en valores intermedios en cada tiempo de muestreo (12, 24, 48 y 72 h) debido a la interacción; mientras que CTL y FA registraron los valores más bajos ( $P \leq 0.05$ ) a las 24 y 48 h. Con respecto a la producción de los diferentes AGV, no se detectaron diferencias ( $P > 0.05$ ) en las concentraciones de butirato, isobutirato e isovalerato por efecto de AF, CTL o su interacción. Por otra parte, las concentraciones de acetato ( $p = 0.002$ ), propionato ( $p = 0.006$ ), valerato ( $p = 0.012$ ) y la producción total de AGV ( $P = 0.0009$ ) fueron modificadas tanto por efecto de la adición individual de AF y CTL como de su uso combinado durante los diferentes tiempos de incubación. A las 48 h, la producción total de AGV y acetato aumentaron debido a la adición individual de AF (~ 25 %), CTL (~ 23 %) y su combinación (~ 19 %), mientras que, a las 72 h, las concentraciones de acetato y la producción total de AGV solamente aumentaron alrededor del 20 % debido a AF y CTL. Adicionalmente, la producción de propionato fue mayor con la inclusión individual y combinada de AF y CTL a las 48 h. Sin embargo, a las 72 h solamente se observó un aumento ( $P \leq 0.05$ ) en las concentraciones de propionato y valerato con el uso individual de AF y CTL. Finalmente, no se detectaron efectos del tiempo de incubación para

la producción total de gas, sin embargo, la producción de gas aumentó por efecto de AF ( $P = 0.014$ ) y su interacción ( $P = 0.040$ ) para el período total de la prueba de incubación, alcanzando un total aproximado de 40 mL.

Hasta el momento existen muy pocos estudios *in vitro* donde se evalúe el efecto de la CTL sobre las características de la FR. Adicionalmente, hasta nuestro conocimiento, no hay estudios que reporten los cambios en estos parámetros debido a la adición de AF, a pesar de que tanto los compuestos fenólicos como las zeolitas han demostrado modular los parámetros de la FR (McCollum & Galylean, 1983; Menci *et al.*, 2021; Nowak *et al.*, 2022; Ghoneem *et al.*, 2022). Por un lado, los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes defaunantes del rumen, disminuyendo la tasa de crecimiento y actividad de algunas bacterias y protozoos (Chesson *et al.*, 1982). Por otra parte, el uso potencial de la CTL como modulador de la FR se ha reportado en la literatura, donde se ha indicado que diversos tiempos de exposición y dosis de este mineral, podrían aumentar las concentraciones ruminales de propionato y mejorar la digestibilidad de los nutrientes, así mismo, varios autores han observado que la CTL regula el pH ruminal y las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> (McCollum & Galylean, 1983; Goodarzi & Nanekarani, 2012; Roque-Jiménez *et al.*, 2018; Ghoneem *et al.*, 2022; Sallam *et al.*, 2022).

En respuesta a la adición de CTL sola o en combinación con AF (AF x CTL), se observaron valores de pH ruminal más altos durante todo el período de incubación. En la literatura, varios autores han informado que CTL actúa como agente amortiguador en el rumen, lo cual es atribuido a su capacidad de intercambiar iones de H<sup>+</sup> por sus oligoelementos contenidos dentro su estructura (White & Ohlrogge, 1983; Amanzougarene & Fondevila, 2022). Es importante mencionar que los valores de pH cercanos a la neutralidad son deseables debido a que se relacionan con tasas óptimas de crecimiento y síntesis de proteína microbiana. Por lo que los resultados obtenidos en este estudio con respecto a la inclusión de CTL eran esperados y sugieren que CTL puede proteger el ambiente ruminal de la fluctuación de pH, así como proporcionar condiciones óptimas para la actividad microbiana.

La reducción en las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> a partir de las 48 h por efecto de la adición de CTL y AF puede estar asociada a una modificación en el metabolismo de las proteínas, una alteración en la actividad bacteriana, o específicamente en el caso de la CTL, a su alta afinidad por los iones de amonio y posterior liberación para una eficaz asimilación por parte de los microorganismos del rumen (Mumpton, 1998; Roque-Jiménez *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020; Ebeid *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2022; Ghoneem *et al.*, 2022). Es conocido que la producción de N-NH<sub>3</sub>, iso-butilato e iso-

valerato son indicadores del metabolismo del nitrógeno en el rumen (proteólisis, peptidólisis y desaminación) (Hartinger *et al.*, 2018). Se ha documentado que los aceites esenciales y compuestos fenólicos reducen la actividad proteolítica ruminal al formar complejos reversibles con las proteínas o al inhibir la actividad de bacterias hiperproductoras de amoníaco o proteolíticas como *Butyrivibrio sp.*, *Streptococcus bovis* y *Selenomonas ruminantium*, aunque ésta última al igual que *Prevotella sp.*, también utiliza amoníaco para la síntesis de aminoácidos (Castillejos *et al.*, 2007; Hartinger *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2020). En este sentido, Zhang *et al.*, (2022) reportaron una disminución en las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> por efecto de la inclusión de orujo de uva (extracto alto en compuestos fenólicos) y de una bacteria ácido láctica (productora de esterases de AF). Los autores asocian este efecto a una menor actividad enzimática por parte de las bacterias del rumen debido a la formación de complejos tanino-proteína, y a una mayor síntesis de proteína microbiana respectivamente. Sin embargo, en este estudio los valores de los iso-AGV no se vieron afectados por AF, por lo que se sugiere que AF tiene un menor efecto sobre la degradación de las proteínas en comparación con otros compuestos fenólicos de alto peso molecular.

Por otro lado, no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ) en la producción de metano entre los diferentes grupos. En contraste con los resultados de la presente investigación, otros estudios han reportado una disminución en las concentraciones de metano por el uso de compuestos fenólicos o CTL (Ebeid *et al.*, 2020; El-Nile *et al.*, 2021; Nowak *et al.*, 2022). Es importante mencionar que CTL puede actuar como un depósito temporal de H<sup>+</sup> molecular y consecuentemente reducir temporalmente su disponibilidad en el rumen. Lo anterior podría conducir a una menor prevalencia de las arqueas metanogénicas en el rumen, debido a que además de utilizar H<sup>+</sup> como fuente de energía, tienen tasas de crecimiento muy lentas (El-Nile *et al.*, 2021; Wakai *et al.*, 2021). Sin embargo, además de la metanogénesis, existen otras vías alternas que pueden incorporar H<sup>+</sup> para la formación de otros productos finales de la FR, como la producción de propionato y en menor medida de acetato (mediante acetogénesis reductora; Beauchemin *et al.*, 2020; El-Nile *et al.*, 2021; Sabry *et al.*, 2021).

En el presente estudio se observó un aumento en las concentraciones de propionato y acetato por efecto de la interacción AF x CTL a las 48 h y solo para factores principales a las 72h. Estos cambios se vieron reflejados en la producción total de AGV, mientras que no se reflejaron en la relación acetato a propionato. Otro cambio notable en el perfil de AGV, fue un aumento en la producción de valerato por efecto de AF y CTL a las 72 h de incubación. Normalmente la producción de valerato en el rumen es mínima, sin embargo, una posible explicación para el

aumento de valerato podría estar asociada con un incremento en la abundancia de *Megasphaera elsdenii*, una bacteria conocida por producir valerato y propionato a partir de lactato (Weimer & Digman, 2013). Las modificaciones observadas sobre el perfil de AGV pueden atribuirse a que el AF y CTL alteren el microbioma ruminal de manera directa o indirecta. Según sus propiedades, ambas moléculas actúan de modo distinto para ocasionar modulaciones en el ambiente ruminal. Por una parte, los compuestos fenólicos pueden actuar como agentes defaunantes contra algunos microorganismos del rumen (Hassan *et al.*, 2020; Kholif & Olafadehan, 2021). Por otra parte, el efecto de la CTL para modular el ambiente ruminal se encuentra relacionado a su propiedad de intercambio catiónico y efecto buffer en el rumen (White & Ohlrogge, 1983; Pond & Mumpton, 1984; Goodarzi & Nanekarani, 2012). Pequeñas variaciones en el pH ruminal crean condiciones que estimulan algunas poblaciones microbianas del rumen.

La producción de gas durante la fermentación *in vitro* es altamente correlacionada con la fermentación de los carbohidratos y la cantidad producida refleja la producción de los diferentes AGV (principalmente la generación de acetato y butirato), por lo cual puede brindar información valiosa para predecir el rendimiento animal y utilización de nutrientes (Getachew *et al.*, 2004).

Los reportes en la literatura sobre la producción de gas por efecto de la adición de compuestos fenólicos o aceites esenciales son diversos. Algunos autores han propuesto que los compuestos fenólicos podrían mejorar la degradabilidad del alimento durante el período de fermentación debido a la reducción del estrés oxidativo del rumen o la inhibición del crecimiento de algunas bacterias (Min *et al.*, 2014; Soltan *et al.*, 2018; Barakat *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha reportado un efecto depresor en las características de FR al incluir una cantidad alta de compuestos fenólicos o aceites esenciales en la dieta. En este sentido, los cambios en las características de FR en respuesta a los compuestos fenólicos pueden depender de la dosis y la estructura molecular del compuesto. En el presente estudio, se observó una mayor producción de gas durante todo el período de incubación en respuesta de la adición de AF. Así mismo, a partir de las 48 h, AF aumentó la producción total de AGV y acetato. Estos hallazgos sugieren que AF podría ocasionar un cambio favorable en la actividad microbiana hacia una mayor intensidad y tasa de digestibilidad. Sin embargo, se requieren estudios sobre degradabilidad del alimento y caracterización del microbioma ruminal para corroborar y asociar estas especulaciones.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

En el presente estudio se observó que el uso combinado de AF y CTL tiene el potencial para modular favorablemente algunos parámetros de la FR *in vitro*, lo cual podría beneficiar el rendimiento animal. De acuerdo con los efectos observados en respuesta a la suplementación con ambos aditivos, se sugiere que AF y CTL podrían influir en el metabolismo de los nutrientes en el rumen. Sin embargo, estos hallazgos obtenidos en el estudio *in vitro* no fueron reflejados en el estudio *in vivo* para mejorar el desempeño productivo de los corderos de pelo en finalización. No obstante, la suplementación individual con AF redujo el consumo diario de los animales sin afectar sus ganancias de peso, esto podría representar un beneficio en cuanto a la reducción de insumos y costos de alimentación. Por otra parte, un hallazgo novedoso en el presente estudio fue que CTL mejoró el color y la presencia de ácidos grasos poliinsaturados en la carne ovina, lo que podría hacerla más atractiva y saludable para el consumo humano. Por lo tanto, si bien AF y CTL no actuaron de forma sinérgica para promover un efecto en el rendimiento animal y calidad de la carne, cada aditivo podría utilizarse de manera individual como estrategia de nutrición animal, para promover la productividad y mejorar la calidad de la carne de los corderos de pelo en finalización.

## 7. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos del estudio *in vitro* sugieren que ambos aditivos tienen el potencial para modular deseablemente los parámetros de FR hacia una mayor eficiencia productiva. Es por esto que se requiere realizar más estudios *in vitro* donde se prueben diferentes dosis y tiempos de exposición (si es posible utilizando sistemas de cultivo continuo) con la finalidad de establecer las condiciones óptimas donde se obtenga el mejor perfil de productos finales de la FR. Además, es necesario llevar a cabo estudios de metagenómica para determinar tanto los cambios en la composición completa del microbioma ruminal como sus funciones biológicas e interacciones por efecto de la suplementación con AF y CTL. Finalmente, una vez establecidas las condiciones óptimas *in vitro*, se recomienda confirmar lo encontrado en estudios *in vivo* adicionales.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ames Jr, L. (1960). The cation sieve properties of clinoptilolite. *American Mineralogist: Journal of Earth and Planetary Materials*, 45(5-6), 689-700.
- Biasi, F., Astegiano, M., Maina, M., Leonarduzzi, G., & Poli, G. (2011). Polyphenol supplementation as a complementary medicinal approach to treating inflammatory bowel disease. *Current Medicinal Chemistry*, 18(31), 4851-4865.
- Biswas, O., Kandasamy, P., Patnaik, S., Lorenzo, J. M., & Das, A. K. (2021). Effect of phytochemicals on quality and safety aspects of meat and meat products. *Indian J. Anim. Health*, 60, 97-108.
- Borneman, W. S., Akin, D. E., & VanEseltine, W. P. (1986). Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(6), 1331-1339.
- Cavalcanti, G. R., Duarte, F. I., Converti, A., & de Lima, Á. A. (2021). Ferulic Acid Activity in Topical Formulations: Technological and Scientific Prospecting. *Current pharmaceutical design*, 27(19), 2289-2298.
- Cayetano-De-Jesus, J.A., Rojo-Rubio, R., Grajales-Lagunes, A., Avendaño-Reyes, L., Macias-Cruz, U., Gonzalez-del-Prado, V., Olmedo-Juárez, A., Chay-Canul, A., Roque-Jiménez, J.A., Lee-Rangel, H.A., 2020. Effect of zilpaterol hydrochloride on performance and meat quality in finishing lambs. *Agriculture* 10, 241.
- Chesson, A., Provan, G. J., Russell, W. R., Scobbie, L., Richardson, A. J., & Stewart, C. (1999). Hydroxycinnamic acids in the digestive tract of livestock and humans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 373-378.
- Chesson, A., Stewart, C. S., & Wallace, R. J. (1982). Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 597-603.
- Choudhury, PK, Salem, AZM, Jena, R., Kumar, S., Singh, R., Puniya, AK (2015). Rumen Microbiology: an overview. En: Puniya, A., Singh, R., Kamra, D. (eds) *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer, Nueva Delhi. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_1)
- Clarke, H. J., Griffin, C., Rai, D. K., O'Callaghan, T. F., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., & Kilcawley, K. N. (2019). Dietary compounds influencing the sensorial, volatile and phytochemical properties of bovine milk. *Molecules*, 25(1), 26.
- Coombs, D. S., Alberti, A., Armbruster, T., Artioli, G., Colella, C., Galli, E., Minato, H. (1997). Recommended nomenclature for zeolite minerals; report of the Subcommittee on Zeolites of the International Mineralogical Association, Commission on New Minerals and Mineral Names. *The Canadian Mineralogist*, 35(6), 1571-1606.
- Coronel-Burgos, F., Plascencia, A., Castro-Pérez, B., Contreras-Pérez, G., Barreras, A., & Estrada-Angulo, A. (2017). Influencia de la sustitución parcial del maíz y de la pasta de soja por zeolita en ovinos en etapa de finalización: Características de la canal, composición tisular y

masa visceral. *Archivos de zootecnia*, 66(254), 223-228.

- Dávila-Ramírez, J. L., Avendaño-Reyes, L., Macías-Cruz, U., Torrentera-Olivera, N. G., Zamorano-García, L., Peña-Ramos, A., & González-Rios, H. (2013). Effects of zilpaterol hydrochloride and soybean oil supplementation on physicochemical and sensory characteristics of meat from hair lambs. *Small Ruminant Research*, 114(2-3), 253-257.
- De Brito, G. F., Ponnampalam, E. N., & Hopkins, D. L. (2017). The effect of extensive feeding systems on growth rate, carcass traits, and meat quality of finishing lambs. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 23-38.
- Demirtaş, A., ÖZTÜRK, H., & PİŞKİN, İ. (2018). Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 65(2), 213-217.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), (2013). Scientific Opinion on the safety and efficacy of clinoptilolite of sedimentary origin for all animal species. *EFSA Journal* 11:30–39.
- Ellison, M., Conant, G., Lamberson, W., Cockrum, R., Austin, K., Rule, D., & Cammack, K. (2017). Diet and feed efficiency status affect rumen microbial profiles of sheep. *Small Ruminant Research*, 156, 12-19.
- El-Nile, A., Elazab, M., El-Zaiat, H., El-Azrak, K. E.-D., Elkomy, A., Sallam, S., & Soltan, Y. (2021). In vitro and in vivo assessment of dietary supplementation of both natural or nano-zeolite in goat diets: Effects on ruminal fermentation and nutrients digestibility. *Animals*, 11(8), 2215.
- Estrada-Angulo, A., Urías-Estrada, J. D., Castro-Pérez, B. I., Contreras-Pérez, G., Angulo-Montoya, C., Barreras, A., Plascencia, A. (2017). Impact of dietary inclusion of clinoptilolite as substitute of soybean meal on growth performance, dietary energetics and carcass traits of feedlot ewes fed a corn-based diet. *Austral journal of veterinary sciences*, 49(2), 123-128.
- Fiems, L. (1987). Effect of beta-adrenergic agonists in animal production and their mode of action. Paper presented at the Annales de zootechnie.
- Forouzani, R., Rowghani, E., & Zamiri, M. J. (2004). The effect of zeolite on digestibility and feedlot performance of Mehraban male lambs given a diet containing urea-treated maize silage. *Animal Science*, 78(1), 179-184.
- Ghoneem, W., El-Tanany, R. R., & Mahmoud, A. (2022). Effect of natural zeolite as a rumen buffer on growth performance and nitrogen utilization of barki Lambs. *Pakistan J. Zool*, 54(3), 1199-1207.
- González-Plascencia, C. 2015. Cinética del ácido ferúlico y ferulato de etilo en bovinos productores de carne. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua.
- González-Rios, H., Dávila-Ramírez, J. L., Peña-Ramos, E. A., Valenzuela-Melendres, M., Zamorano-García, L., Islava-Lagarda, T. Y., & Valenzuela-Grijalva, N. V. (2016). Dietary supplementation of ferulic acid to steers under commercial feedlot feeding conditions improves meat quality and shelf life. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 111-121.
- González-Rios, H., Lozano, D. A. G., & Mir, A. B. (2013). Ferulic acid as feed supplement in beef cattle to promote animal growth and improve the meat quality of the carcass and the meat:

Google Patents. Publicación de aplicación: US20130041036A1.

- González-Ronquillo, M., & Hernandez, J. C. A. (2017). Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food control*, 72, 255-267.
- Goodarzi, M., & Nanekarani, S. (2012). The effects of calcic and potassic clinoptilolite on ruminal parameters in Lori breed sheep. *APCBEE Procedia*, 4, 140-145.
- Gorewit, R. C. (1983). Pituitary and thyroid hormone responses of heifers after ferulic acid administration. *Journal of Dairy Science*, 66(3), 624-629.
- Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the nutrition Society*, 62(2), 279-290.
- Hassan, F.-u., Arshad, M. A., Ebeid, H. M., Rehman, M. S.-u., Khan, M. S., Shahid, S., & Yang, C. (2020). Phytogenic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 575801.
- Hcini, E., Ben Slima, A., Kallel, I., Zormati, S., Traore, A. I., & Gdoura, R. (2018). Does supplemental zeolite (clinoptilolite) affect growth performance, meat texture, oxidative stress and production of polyunsaturated fatty acid of Turkey poult? *Lipids in health and disease*, 17(1), 1-9.
- Heitzman, R. (1979). The efficacy and mechanism of action of anabolic agents as growth promoters in farm animals. *Journal of steroid biochemistry*, 11(1), 927-930.
- Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (1988). *Rumen microbial ecosystem*: Springer Science & Business Media.
- Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., ... & Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American journal of clinical nutrition*, 88(1), 38-50.
- Hungate, R. E. (2013). *The rumen and its microbes*: Elsevier.
- Jha, B., & Singh, D. N. (2016). Fly ash zeolites. *Advanced Structured Materials*, 78, 5-31.
- Jung, H. G., & Fahey Jr, G. C. (1983). Nutritional implications of phenolic monomers and lignin: a review. *Journal of Animal Science*, 57(1), 206-219.
- Kim, S.-H., Mamuad, L. L., Kim, E.-J., Sung, H.-G., Bae, G.-S., Cho, K.-K., Lee, S.-S. (2018). Effect of different concentrate diet levels on rumen fluid inoculum used for determination of in vitro rumen fermentation, methane concentration, and methanogen abundance and diversity. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 359-367.
- Kardaya, D., Sudrajat, D., & Dihansih, E. (2012). Efficacy of dietary urea-impregnated zeolite in improving rumen fermentation characteristics of local lamb. *Media Peternakan*, 35(3), 207-207.
- Kholif, A. E., & Olafadehan, O. A. (2021). Essential oils and phytogenic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews*, 20(6), 1087-1108.
- Kraljević Pavelić, S., Simović Medica, J., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., & Pavelić, K. (2018). Critical review on zeolite clinoptilolite safety and medical applications in vivo.

*Frontiers in pharmacology*, 1350.

- Kristensen, N. B., Danfaer, A., & Agergaard, N. (1998). Absorption and metabolism of short-chain fatty acids in ruminants. *Archives of Animal Nutrition*, 51(2-3), 165-175.
- Li, Y., Li, L., & Yu, J. (2017). Applications of zeolites in sustainable chemistry. *Chem*, 3(6), 928-949.
- Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M. E., Chi, F., Cravens, R. L., Taek Oh, S., Gay, C. G. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Veterinary research*, 49(1), 1-18.
- Macías-Cruz, U., Perard, S., Vicente, R., Álvarez, F., Torrentera-Olivera, N., González-Rios, H., Avendaño-Reyes, L. (2014). Effects of free ferulic acid on productive performance, blood metabolites, and carcass characteristics of feedlot finishing ewe lambs. *Journal of animal science*, 92(12), 5762-5768.
- Macías-Cruz, U., Vicente-Pérez, R., López-Baca, M., González-Rios, H., Correa-Calderon, A., Arechiga, C., & Avendano-Reyes, L. (2018). Effects of dietary ferulic acid on reproductive function and metabolism of pre-pubertal hairbreed ewes during the anestrus season. *Theriogenology*, 119, 220-224.
- Mallek, Z., Fendri, I., Khannous, L., Ben Hassena, A., Traore, A. I., Ayadi, M.-A., & Gdoura, R. (2012). Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid. *Lipids in health and disease*, 11(1), 1-7.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. doi: 10.1093/ajcn/79.5.727
- Martínez-González, S., Aguirre-Ortega, J., Gómez-Danés, A. A., Ruíz-Félix, M., Lemus-Flores, C., Macías-Coronel, H., Moreno-Flores, L.A., Salgado-Moreno, S., Ramírez-Lozano, M. H. (2010). Tecnologías para mejorar la producción ovina en México. CONACYT.
- McCullum, F., & Galyean, M. (1983). Effects of clinoptilolite on rumen fermentation, digestion and feedlot performance in beef steers fed high concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 56(3), 517-524.
- McGrath, J., Duval, S. M., Tamassia, L. F., Kindermann, M., Stemmler, R. T., de Gouvea, V. N., Celi, P. (2018). Nutritional strategies in ruminants: A lifetime approach. *Research in veterinary science*, 116, 28-39.
- Mendoza, G., Ricalde, R., & Hernández, P. (2017). Alimentación de ganado bovino, 3.
- Ming, D. W., & Allen, E. R. (2001). Use of natural zeolites in agronomy, horticulture and environmental soil remediation. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 45(1), 619-654.
- Muir, P. D., Deaker, J. M., & Bown, M. D. (1998). Effects of forage-and grain-based feeding systems on beef quality: A review. *New Zealand journal of agricultural research*, 41(4), 623-635.
- Mumpton, F. (1998). The role of natural zeolites in agriculture and aquaculture, *Zeo-Agriculture*: Westview Press, Boulder, Colorado.

- Nicolás-López, P., Macías-Cruz, U., Avendaño-Reyes, L., Valadez-García, K. M., Mellado, M., Meza-Herrera, C. A., Días-Molina, R., Castañeda, V.J., Vicente-Pérez, R., Luna-Palomera, C. (2022). Ferulic acid supplementation for 40 days in hair ewe lambs experiencing seasonal heat stress: short-term effects on physiological responses, growth, metabolism, and hematological profile. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(5), 11562-11571.
- Norouzian, M., Valizadeh, R., Khadem, A., Afzalzadeh, A., & Nabipour, A. (2010). The effects of feeding clinoptilolite on hematology, performance, and health of newborn lambs. *Biological trace element research*, 137(2), 168-176.
- Peña, E., Gonzalez, H., Rosales, F., Jiménez, I., Valenzuela, M., Peña, A., Dávila, J. (2018). PSII-21 Fiber type characterization and meat quality of hair lambs supplemented with ferulic acid. *Journal of Animal Science*, 96(Suppl 3), 75-75.
- Peña-Torres, E. F., Castillo-Salas, C., Jiménez-Estrada, I., Muhlia-Almazán, A., Peña-Ramos, E. A., Pinelli-Saavedra, A., Macías-Cruz, U. (2022). Growth performance, carcass traits, muscle fiber characteristics and skeletal muscle mRNA abundance in hair lambs supplemented with ferulic acid. *Journal of animal science and technology*, 64(1), 52.
- Peña-Torres, E. F., Dávila-Ramírez, J. L., Peña-Ramos, E. A., Valenzuela-Melendres, M., Pinelli-Saavedra, A., Avendaño-Reyes, L., & González-Rios, H. (2021). Effects of dietary ferulic acid on growth performance, carcass traits and meat quality of heifers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(2), 548-554.
- Platt, J. P., Anderson, M. J., & Johnson, B. J. (2012). The effect of ferulic acid on myogenic regulators of growth in bovine satellite cells. In *Texas Tech University Undergraduate Research Conference*.
- Pond, W. G., & Mumpton, F. A. (1984). *Zeo-agriculture: Use of natural zeolites in agriculture and aquaculture*: Westview press.
- Quintanilla-Medina, J. J., González-Reyna, A., Hernández-Meléndez, J., Limas-Martínez, A. G., Carreón-Pérez, A., & Martínez-González, J. C. (2018). Producción de ovinos de pelo bajo condiciones de pastoreo en el noreste de México. *Revista de investigaciones Veterinarias del Perú*, 29(2), 544-551.
- Rahman, I., Biswas, S. K., & Kirkham, P. A. (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology*, 72(11), 1439-1452.
- Roque-Jiménez, J., Pinos-Rodríguez, J., Rojo-Rub, R., Mendoza, G., Vazquez, A., De Jesus, J. C., & Lee-Rangel, H. (2018). Effect of natural zeolite on live weight changes, ruminal fermentation and nitrogen metabolism of ewe lambs. *South African Journal of Animal Science*, 48(6).
- Sallam, S. M., Abo-Zeid, H. M., Abaza, M. A., & El-Zaiat, H. M. (2022). Nutrient intake, digestibility, growth performance, and carcass of sheep fed urea-based diet supplemented with natural clinoptilolite. *Animal Science Journal*, 93(1), e13689.
- Shi, C., Zhang, X., Sun, Y., Yang, M., Song, K., Zheng, Z., Dong, R. (2016). Antimicrobial activity of ferulic acid against *Cronobacter sakazakii* and possible mechanism of action. *Foodborne pathogens and disease*, 13(4), 196-204.
- SIAP. 2021a. Reporte nacional de la producción de carne ovina. Servicio de Información

Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecResumen.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecResumen.jsp). (Accesado: 10 de Enero de 2023).

SIAP. 2021b. Información sobre el número de animales que se crían en el país con fines de producción. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762>. (Accesado: 10 de enero de 2023).

SIAP. 2021c. Resumen concentrado de la producción nacional. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecConcentrado.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecConcentrado.jsp) (Accesado: 10 de enero de 2023).

Soberon, M. A., Cherney, J. H., Liu, R. H., Ross, D. A., & Cherney, D. J. R. (2012). Free ferulic acid uptake in lactating cows. *Journal of dairy science*, 95(11), 6563-6570.

Soberon, M., Cherney, D., & Cherney, J. (2012). Free ferulic acid uptake in ram lambs. *Journal of Animal Science*, 90(6), 1885-1891.

Soltan, Y. A., & Patra, A. K. (2021). Ruminant microbiome manipulation to improve fermentation efficiency in ruminants. *Animal Feed Science and Nutrition-Production, Health and Environment*.

Urbaniak, A., Szeląg, M., & Molski, M. (2013). Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. *Computational and Theoretical Chemistry*, 1012, 33-40.

Urías-Estrada, J., López-Soto, M., Barreras, A., Aguilar-Hernández, J., González-Vizcarra, V., Estrada-Angulo, A., Plascencia, A. (2017). Influence of zeolite (clinoptilolite) supplementation on characteristics of digestion and ruminal fermentation of steers fed a steam-flaked corn-based finishing diet. *Animal Production Science*, 58(7), 1239-1245.

Valadez-García, K. M., Avendaño-Reyes, L., Díaz-Molina, R., Mellado, M., Meza-Herrera, C. A., Correa-Calderón, A., & Macías-Cruz, U. (2021). Free ferulic acid supplementation of heat-stressed hair ewe lambs: Oxidative status, feedlot performance, carcass traits and meat quality. *Meat Science*, 173, 108395.

Valadez-García, K. M., Avendaño-Reyes, L., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., Díaz-Molina, R., González-Rios, H., & Macías-Cruz, U. (2021). Ferulic acid in animal feeding: mechanisms of action, productive benefits, and future perspectives in meat production. *Food Bioscience*, 43, 101247.

Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D., & González-Rios, H. (2017). Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *Journal of animal science and technology*, 59(1), 1-17.

Valenzuela-Grijalva, N., Jiménez-Estrada, I., Mariscal-Tovar, S., López-García, K., Pinelli-Saavedra, A., Peña-Ramos, E. A., González-Rios, H. (2021). Effects of ferulic acid supplementation on growth performance, carcass traits and histochemical characteristics of muscle fibers in finishing pigs. *Animals*, 11(8), 2455.

Valpotić, H., Gračner, D., Turk, R., Đuričić, D., Vince, S., Folnožić, I., & Samardžija, M. (2017).

Zeolite clinoptilolite nanoporous feed additive for animals of veterinary importance: potentials and limitations. *Periodicum biologorum*, 119(3), 159-172.

- Van Houtert, M. F. J. (1993). The production and metabolism of volatile fatty acids by ruminants fed roughages: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 43(3-4), 189-225.
- Vázquez-Martínez, I., Jaramillo-Villanueva, J. L., Bustamante-González, Á., Vargas-López, S., Calderón-Sánchez, F., Torres-Hernández, G., & Pittroff, W. (2018). Estructura y tipología de las unidades de producción ovinas en el centro de México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 15(1), 85-97
- Vicente Pérez R., Macías Cruz U., Avendaño Reyes L., Correa-Calderón A., López Baca M. & Lara Rivera A. (2020) Impacto del estrés por calor en la producción de ovinos de pelo. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(1), 205-222.
- Wang, Y., Wang, W., Wang, R., Meng, Z., Duan, Y., An, X., & Qi, J. (2019). Dietary supplementation of ferulic acid improves performance and alleviates oxidative stress of lambs in a cold environment. *Canadian Journal of Animal Science*, 99(4), 705-712.
- Wang, Y.-L., Wang, W.-K., Wu, Q.-C., & Yang, H.-J. (2022). The release and catabolism of ferulic acid in plant cell wall by rumen microbes: A review. *Animal Nutrition*, 9, 335-344.
- White, J. L., & Ohlrogge, A. J. (1983). Ion exchange materials to increase consumption of non-protein nitrogen by ruminants: Google Patents.
- Windisch, W., & Kroismayr, A. (2006, September). The effects of phytobiotics on performance and gut function in monogastrics. In *World nutrition forum: The future of animal nutrition* (pp. 85-90). Austria, Vienna: University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna.