



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

**Efecto de nanopartículas de selenio incorporadas en forraje
(*Festuca arundinacea*) para el mejoramiento en la digestibilidad y
disminución de gases ruminales evaluado en un modelo *in vitro***

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. en C. Uriel González Lemus

Director

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Codirectora

Dra. Gabriela Medina Pérez

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., febrero de 2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DOCTORAL

**Efecto de nanopartículas de selenio incorporadas en forraje
(*Festuca arundinacea*) para el mejoramiento en la digestibilidad y
disminución de gases ruminales evaluado en un modelo *in vitro***

Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA

M. en C. Uriel González Lemus

Director

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Codirectora

Dra. Gabriela Medina Pérez

Asesores

Dr. Isaac Almaraz Buendía

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dr. Armando Peláez Acero

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., febrero de 2023

23/02 /2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial del **PROYECTO TERMINAL O TESIS** del programa educativo de posgrado titulado **“Efecto de nanopartículas de selenio incorporadas en forraje (*Festuca arundinacea*) para el mejoramiento en la digestibilidad y disminución de gases ruminales evaluado en un modelo *in vitro*”**, realizado por el sustentante **Uriel González Lemus** con **261840** perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Agropecuarias**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”
Lugar, Hidalgo a 23 de febrero del 2023

El Comité Tutorial



Dr. Rafael Germán
Campos Montiel

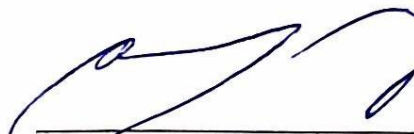


Dra. Gabriela Medina
Pérez
Codirector



Dr. Isaac Almaraz
Buendía
Asesor

Dr. Rubén Jiménez
Alvarado
Asesor



Dr. Armando Peláez
Acero
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Mamá, no solo me diste la vida, me hiciste la persona que hoy en día soy, muchas gracias por tu apoyo incondicional, nunca me dejes, te amo con mi vida entera y jamás podré pagarte todo lo que has hecho por mí. Que la vida me regale muchos y muchos años de tu amor, es lo único que deseo. Te amo mucho mamá.

Papá, agradezco a la vida tener un padre como tú, Eres al igual que mi madre la persona más importante en mi vida. Eres lo máximo, no hay palabras suficientes para agradecer todo tu apoyo y amor. Por muchos y muchos años a tu lado. Todo lo que soy es gracias a ti, ni 10 vidas son suficientes para pagarte lo mucho que has hecho por mí. Te amo.

Edgar, hermano, gracias por siempre estar a mi lado, no importa lo que haga, siempre cuento con tu apoyo y sé que siempre así lo será, nunca podré pagarte todo lo que has hecho por mí. Te amo mucho hermano y que la vida y el éxito siempre esté de tu lado.

Ana Karen, amor mío. Mi mejor amiga y confidente, muchas gracias por lograr que cada día sea una mejor persona, soy tan afortunado de tenerte a mi lado, gracias por apoyarme, motivarme y alegrar mi vida. Los días a tu lado son increíbles y muy divertidos, espero sin duda alguna tener el privilegio de compartir toda mi vida contigo. Te amo.

Nestor, uno de mis mejores amigos. Agradezco el apoyo que me has dado desde que te conocí, Y si bien estás lejos, tu amistad es como si estuvieras un lado mío. Gracias por estar a mi lado en las buenas y malas, nunca olvidaré todas las aventuras que hemos pasado juntos y puedo asegurarte algo, siempre podrás contar conmigo y de mi tiempo cuando lo necesites, gracias, mejor amigo.

Antonio de Jesús Cenobio, gracias por ser mi amigo y siempre brindarme tu apoyo. Sin duda alguna tus consejos han sido muy importantes, y sin ti esto hubiera sido muy difícil. Eres un hermano para mí, y lo que necesites estaré sin duda alguna ahí. Por qué has sido un maestro y un gran amigo incondicional. Por más momentos juntos y por una amistad inquebrantable. Gracias por todoToño.

Denis, mi gran amiga, un nuevo paso en nuestras vidas y afortunadamente sigues hombro con hombro a mi lado, gracias por tu amistad y todos esos momentos de alegría y diversión, por más logros y lo más importante por más años de esta hermosa amistad.

Maestro Lucio González Montiel es poco el tiempo conviviendo contigo, pero toda la vida conociéndote, para ser el mejor, debes juntarte con los mejores y tú eres de los mejores. Muchas gracias por tu amistad y tiempo, mi querido Lucio, gracias por todos tus consejos y conocimientos. Eres una excelente persona, y te quiero mucho amigo.

AGRADECIMIENTOS

José Antonio Estefes, muchas gracias por tu amistad y enseñanzas. Te quiero mucho amigo y puedes contar conmigo.

Dr Rafael Germán Campos Montiel, gracias por sus consejos, por ser parte de mi formación y por dejarme ser parte de su equipo. Muchas gracias, profesor y amigo.

Maestro Jesús Franco Fernández, sin duda usted ha sido una pieza fundamental en mi vida profesional, desde que lo conocí, siempre me ha motivado y ayudado. Siempre con ese gran profesionalismo y moral que le distingue. Sin duda es mi modelo para seguir, lo admiro mucho y agradezco su amistad y apoyo. Lo quiero mucho Inge.

Ingeniero Espino, sin duda alguna el mejor de mis profesores, y me atrevo a decir que es el mejor maestro que pudo tener el Instituto de Ciencias Agropecuarias, sin duda doy gracias a la vida por haber tenido ese privilegio de ser su alumno y su compañero, situación que pocos pueden presumir. Siempre admiraré su voluntad inquebrantable, su gran inteligencia y su carácter colérico. Larga vida y salud para usted. Lo quiero mucho inge.

Un especial agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del proyecto.

DEDICATORIA

Dedicatoria especial para todos mis compañeros, amigos y familiares, al Instituto de Ciencias Agropecuarias y en general a la UAEH.

¡Muchas gracias!

RESUMEN

La ganadería ha sido criticada por su gran producción de gases de efecto invernadero (GEI) debido al uso de forrajes. El avance de la ciencia ha llevado a un aumento en el número de estudios basados en nanotecnologías, la suplementación con Nanopartículas (NPs) de Selenio (Se) en la nutrición animal ha encontrado resultados positivos en la fermentación de materia orgánica, producción de ácidos grasos y microorganismos ruminales. *Festuca arundinacea* Schreber es una de las gramíneas forrajeras más utilizadas por su duración, productividad y gran amplitud ecológica y adaptabilidad. Los objetivos de este estudio fueron evaluar el efecto de la biofortificación foliar de NPs de Se de tres diferentes concentraciones de nanopartículas de selenio (0, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm) en *F. arundinacea* Schreb los parámetros fenológicos como tamaño de raíz, altura del pasto y producción de biomasa verde, así como los parámetros fisicoquímicos PC: proteína cruda, Extracto etéreo (EE), Fibra cruda (CF), Fibra detergente neutra (NDF), Fibra detergente ácida (ADF), Extracto Libre de Nitrógeno (NFE), el contenido de Fenoles totales, flavonoides totales, taninos, selenio y actividad antioxidante (ABTS y DPPH). Además determinar el efecto de estos pastos bio-fortificados con NPs de Se en digestibilidades *in vitro* de cuantificando la producción de gases de efecto invernadero (GEI) (gas total y metano) compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides, taninos y selenio) y los parámetros de digestión tales como digestión *in vitro* de la materia seca (DIVMS), producción total de gas ($A_{\text{total gas}}$), producción de metano (ACH_4), pH, tiempo de incubación en el cual la mitad del total de gas A (t_0) se ha producido, la tasa de digestión del sustrato (S), tS_{max} y la fase de latencia (L), así como la producción de ácidos grasos volátiles (AGV), fenoles totales, flavonoides totales y taninos en el fluido ruminal. Los mejores resultados se obtuvieron con la fertilización foliar de los tratamientos con 3.0 y 4.5 ppm en el tamaño de raíz (12.79 ± 0.71 y 15.59 ± 0.93 cm) y altura del pasto (26.18 ± 1.08 y 29.34 ± 1.11 cm). El pasto fertilizado con 4.5 ppm mostró un incremento y mayor contenido de selenio (0.3215 ± 0.01 , 0.3191 ± 0.01 y 0.3218 ± 0.01 ppm/kg MS), concentración de fenoles totales (249.56 ± 7.89 , 280.02 ± 4.33 y 274 ± 7.33 mgEAG/100 g DM) y concentración de flavonoides totales (63.56 ± 1.28 , 64.96 ± 2.24 , 61.16 ± 1.28 mgQE/100g DM), además se obtuvo la mejor DIVMS en el tratamiento con aplicación

foliar de 4.5 ppm de NPs de Se en las tres diferentes cosechas (60.46, 59.2 y 59.42%) y la menor producción gas total (148.37, 135.22 y 141.93 mL gMS⁻¹) y CH₄ (53.42, 52.65 y 53.73 mL g MS⁻¹), mayor concentración de AGV totales (31.01, 31.26 y 31.24 mmol L⁻¹). El forraje de *F. arundinacea* Schreb fertilizado con 4.5 ppm liberó durante la fermentación *in vitro* un mayor contenido de fenoles totales (98.77, 99.31 y 99.08 mgEAG/100 mL), flavonoides (34.96, 35.44 y 34.96 mgQE/100 g MS), taninos (27.22, 27.35 y 27.99 mgEC/100g mL) y selenio (0.0811, 0.0814 y 0.0812 ppm). La biofortificación con NPs de Se es una buena alternativa para mejorar las características fisicoquímicas del cultivo de *Festuca arundinacea*, mejora la digestibilidad del sustrato, enriquece los cultivos de Se y disminuir los gases de efecto invernadero.

Palabras clave: nanopartículas, selenio, foliar, fenoles, flavonoides, taninos, digestibilidad, metano.

ABSTRACT

Livestock has been criticized for its large production of greenhouse gases (GHG) due to the use of fodder. The advancement of science has led to an increase in the number of studies based on nanotechnologies, supplementation with Selenium (Se) Nanoparticles (NP) in animal nutrition has found positive results in the fermentation of organic matter, production of fatty acids and ruminal microorganisms. *Festuca arundinacea* Schreber is one of the most used forage grasses due to its duration, productivity and great ecological amplitude and adaptability. The objectives of this study were to evaluate the effect of foliar biofortification of Se NPs of three different concentrations of selenium nanoparticles (0, 1.5, 3.0 and 4.5 ppm) in *F. arundinacea* Schreb the phenological parameters such as root size, grass height and green biomass production, as well as the physicochemical parameters PC: crude protein, ether extract (EE), crude fiber (CF), Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), Nitrogen Free Extract (NFE), the content of total Phenols, total flavonoids, tannins, selenium and antioxidant activity (ABTS and DPPH). In addition, to determine the effect of these bio-fortified pastures with Se NPs on *in vitro* digestibilities by quantifying the production of greenhouse gases (GHG) (total gas and methane), bioactive compounds (phenols, flavonoids, tannins and selenium) and the parameters of digestion such as *in vitro* dry matter digestion (IVDMD), total gas production ($A_{total\ gas}$), methane production (A_{CH_4}), pH, incubation time in which half of the total gas A (to) is has produced, the rate of digestion of the substrate (S), t_{Smax} and the lag phase (L), as well as the production of volatile fatty acids (VFA), total phenols, total flavonoids and tannins in the ruminal fluid. The best results were obtained with foliar fertilization of the treatments with 3.0 and 4.5 ppm in root size (12.79 ± 0.71 and 15.59 ± 0.93 cm) and grass height (26.18 ± 1.08 and 29.34 ± 1.11 cm). The grass fertilized with 4.5 ppm showed an increase and higher content of selenium (0.3215 ± 0.01 , 0.3191 ± 0.01 and 0.3218 ± 0.01 ppm/kg DM), concentration of total phenols (249.56 ± 7.89 , 280.02 ± 4.33 and 274 ± 7.33 mgEAG/ 100 g DM) and concentration of total flavonoids (63.56 ± 1.28 , 64.96 ± 2.24 , 61.16 ± 1.28 mgQE/100g DM), in addition, the best DIVMS was obtained in the treatment with foliar application of 4.5 ppm of Se NPs in the three different crops (60.46, 59.2 and 59.42%) and the lower total gas production (148.37, 135.22 and

141.93 mL gMS⁻¹) and CH₄ (53.42, 52.65 and 53.73 mL g DM⁻¹), higher concentration of total AGV (31.01, 31.26 and 31.24 mmol L⁻¹). The *F. arundinacea* Schreb forage fertilized with 4.5 ppm released during in vitro fermentation a higher content of total phenols (98.77, 99.31 and 99.08 mgEAG/100 mL), flavonoids (34.96, 35.44 and 34.96 mgQE/100 g DM), tannins (27.22, 27.35 and 27.99 mgEC/100g mL) and selenium (0.0811, 0.0814 and 0.0812 ppm). Biofortification with Se NPs is a good alternative to improve the physicochemical characteristics of the *Festuca arundinacea* crop, improves the digestibility of the substrate, enriches the Se crops and reduces greenhouse gases.

Keywords: nanoparticles, selenium, foliar, phenols, flavonoids, tannins, digestibility, methane.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
1.	132.
	163.
	183.1 Rumiantes
	18
3.2 Fisiología animal	18
3.2.1 Retículo	18
3.2.2 Rumen	19
3.2.3 Omaso	20
3.2.4 Abomaso	20
3.3 Fermentación anaerobia del rumen	21
3.3.1 Síntesis de ácidos grasos volátiles en rumiantes	21
3.3.1.1 Ácido acético	22
3.3.1.2 Ácido propiónico	22
3.3.1.3 Ácido butírico	22
3.4 Emisiones de gases de efecto invernadero	23
3.4.1 Producción de metano en el rumen	24
3.5 Pastos y forrajes	24
3.5.1 <i>Festuca arundinacea</i> Schreber	25
3.6 Nanotecnología	25
3.6.1 Clasificación de la nanotecnología	26
3.6.2 Diversos productos en nanotecnologías	27
3.6.2.1 Nanoalambres:	27
3.6.2.2 Nanobombas	27
3.6.2.3 Nanotransportadores	28

3.6.2.4 Nanopartículas	28
3.7 Aplicaciones de nanopartículas en la agricultura	29
3.8 Selenio y nanopartículas de Selenio	30
3.9 Biofortificación de NP en plantas	30
3.9.1 Biofortificación de plantas con nanopartículas de selenio	31
3.9.2 Absorción de NP de Se en las plantas	31
3.10 Uso de nanoelementos en Nutrición animal	32
4.	334.1 Objetivo general
	33
4.2 Objetivos específicos	33
4.3 Hipótesis	34
5.	355.1 Ubicación del experimento
	35
5.2 Obtención de la semilla <i>Festuca arundinacea Schreber</i> y nanopartículas de Selenio	35
5.3 Germinación y método de siembra	35
5.4 Aplicación foliar de las nanopartículas de Selenio	36
5.5 Análisis morfológicos en pasto <i>Festuca arundinacea Schreber</i>	36
5.7 Caracterización fisicoquímica del pasto <i>Festuca arundinacea Schreber</i>	37
5.7.1 Humedad	37
5.7.2 Cenizas	37
5.7.3 Proteína	38
5.7.4 Extracto etéreo	39
5.7.5 Fibra cruda	39
5.7.5.2 Fibra detergente neutro	40
5.7.5.3 Fibra detergente ácida	41
5.8 Extracción de compuestos bioactivos del pasto <i>Festuca arundinacea</i>	41
5.9 Fenoles totales en pasto <i>Festuca arundinacea</i>	41
5.10 Flavonoides totales en pasto <i>Festuca arundinacea</i>	42
5.11 Taninos totales	43
5.12 Actividad antioxidante del pasto	44
5.12.1 Actividad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH	44
5.12.2 Actividad antioxidante mediante la inhibición del radical ABTS	44

5.13 Determinación de Selenio por espectroscopía de absorción atómica	46
5.14 Obtención del líquido ruminal	47
5.15 Fermentación y cinética de producción de gas <i>in vitro</i>	47
5.16 Producción de gas total y estimación de gas metano	48
5.17 Digestibilidad <i>in vitro</i> de materia seca	49
5.18 Determinación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases	50
5.19 Determinación de compuestos bioactivos después de la digestión <i>in vitro</i>	51
5.19.1 Fenoles totales	51
5.19.2 Flavonoides totales	51
5.19.3 Taninos totales	52
5.20 Análisis estadístico	52
6. 536.1 Producción de biomasa y características fenológicas de <i>F. arundinacea</i> Schreb. Plantas	53
6.2 Parámetros nutricionales de <i>F. arundinacea</i> Schreb.	54
6.3 Compuestos Bioactivos	57
6.3.1 Contenido Total de fenoles, flavonoides, taninos	57
6.4 Contenido de Selenio	59
6.5 Actividad antioxidante en la inhibición de los radicales DPPH y ABTS	61
6.6 Producción <i>in vitro</i> de gas total y metano	62
6.7 pH y DIVMS	66
6.8 Cuantificación de ácidos grasos (AGV)	68
6.9 Determinación de compuestos bioactivos en líquido ruminal después de la digestión	69
CONCLUSIÓN	71
BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Aparato digestivo de los rumiantes	20
Fig. 2. Síntesis de ácidos grasos volátiles a partir de monosacáridos en el rumen.	23
Fig. 3. Composición química de los forrajes.	25
Fig. 4. Curva de calibración para estimar cantidad de fenoles totales	43
Fig. 5. Curva de calibración para cuantificar flavonoides	44
Fig. 6. Efectos de diferentes concentraciones de nanopartículas de selenio (NPs Se) aplicadas por vía foliar sobre las características de gramíneas forrajeras (Festuca arundinacea Schreb .): (A) Control 0; (B) 1,5 ppm; (C) 3,0 ppm; (D) 4,5 ppm	54
Fig. 7. Perfiles de gas total acumulado de los distintos tratamientos. (a) Primera cosecha, (b) Segunda cosecha y (c) Tercera cosecha.	64
Fig. 8. Perfiles de metano acumulado de los distintos tratamientos. (a) Primera cosecha, (b) Segunda cosecha y (c) Tercera cosecha.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de las nanopartículas de selenio utilizadas para la fertilización foliar del pasto (<i>Festuca arundinacea</i> Schreb.) en un experimento de invernadero de 90 días;	
Error! Marcador no definido. Tabla 2. Características morfológicas del pasto (<i>Festuca arundinacea</i>)	54
Tabla 3. Caracterización nutricional del pasto (<i>Festuca arundinacea</i>) biofortificado foliarmente con distintas concentraciones de NPsSe.	57
Tabla 4. Contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos totales y selenio en los distintos tratamientos de pasto (<i>Festuca arundinacea</i>) biofortificado foliarmente con distintas concentraciones de NPs de Se durante las distintas cosechas.	60
Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de los pastos biofortificados con NPs de Se	62
Tabla 6. Parámetros de digestibilidad después de 92 h de fermentación	67
Tabla 7. Concentración final de AGV producidos durante la fermentación ruminal del forraje (<i>Festuca arundinacea</i>).	69
Tabla 8. La concentración final de fenoles totales, flavonoides totales, taninos totales y Se después de la fermentación ruminal de <i>Festuca arundinacea</i> con NP de Se.	70

1. INTRODUCCIÓN

Festuca arundinacea (*Festuca arundinacea* Schreber) es un forraje de clima templado muy apreciado por su rusticidad, plasticidad fenotípica y calidad en sistemas de producción ganadera extensiva, especialmente en rumiantes (Gibson & Newman, 2001; Devesa et al., 2013). El *Festuca* es ampliamente utilizado como forraje por su gran amplitud ecológica y adaptabilidad; también es útil en la conservación del suelo debido a su extenso y penetrante sistema de raíces. Los forrajes son el principal soporte de la agricultura sostenible y constituyen uno de los principales recursos para el éxito del sistema de producción animal (Chen et al., 2003). El selenio (Se) es un micronutriente esencial para los animales; sin embargo, parte del área utilizada para la agricultura contiene niveles bajos de este oligoelemento. Adicionalmente, el Se puede tener efectos benéficos en el crecimiento y desarrollo de las plantas al incrementar su tolerancia a diferentes tipos de estrés y generar la síntesis de fitoquímicos con propiedades antioxidantes (Hartikainen, 2005; Germ, Stibil & Kreft, 2007). Por lo tanto, el Se puede estar presente, pero en formas químicas no disponibles para los organismos; como resultado, existe una deficiencia en el contenido de Se en plantas, animales y otros organismos en la cadena alimentaria (Ducsay, 2006; Lira et al., 2018).

La biofortificación es el proceso de aumentar el valor nutricional de los cultivos alimentarios al incrementar el contenido de minerales, vitaminas y minerales en las plantas (Bamberg et al., 2019). La biofortificación se ha llevado a cabo en productos agrícolas (trigo, sorgo, guisantes, arroz y hortalizas) y en algunas variedades forrajeras como la alfalfa que carecen de Se debido a las bajas concentraciones de este oligoelemento en el suelo (Motesarezadeh, Ghorbani & Alikhan, 2020). De los métodos de biofortificación utilizados para las plantas, la aplicación foliar ha demostrado ser más eficaz que la fertilización en suelo (Ros et al., 2016). Los beneficios que proporciona el Se en la salud de los animales de granja, mejoran el rendimiento reproductivo y la función inmunológica y homeostática (Nedelkov et al., 2020). Varios estudios relacionan la ausencia del consumo de Se con desarrollo y

crecimiento; y con problemas reproductivos y metabólicos, especialmente en rumiantes (Meyer et al., 2014; Wang et al., 2019).

La producción agrícola y ganadera son los principales contribuyentes en las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero (GEI) a la atmósfera (Møller et al., 2022). Las emisiones de GEI como dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) son compuestos que inciden directamente en el cambio climático; porque estas moléculas pueden absorber la energía radiante que llega a la tierra (Espino-García et al., 2020). Las principales fuentes antropogénicas de GEI provienen del sector agrícola, ya que los rumiantes emiten 100 millones de toneladas de CH₄, lo que representa aproximadamente el 20% de las emisiones totales al año (Duin et al., 2016). El CH₄ es uno de los tres principales gases de efecto invernadero junto con el CO₂, siendo este último el segundo GEI antropogénico más importante en términos de potencial de calentamiento global (Kumari et al., 2020). La emisión de CH₄ en rumiantes está influenciada por la fermentación del alimento en el rumen, que depende de la composición de la dieta (granos y forrajes), la tasa de digestibilidad del alimento, el procesamiento previo y la frecuencia de alimentación. En términos de energía, la emisión de CH₄ representa una pérdida, y en términos ambientales favorece la degradación de la capa de ozono y el calentamiento global (Alemu et al., 2011; Caslavova et al., 2019).

Se han desarrollado diferentes estrategias para disminuir la producción de CH₄ en rumiantes como el uso de vacunas, selección genética y nutrición animal. Debido a lo anterior, estudios centrados en las nanotecnologías, como el desarrollo de nanopartículas (NPs) y su aplicación en plantas de cultivo han incrementado. Las NPs tienen diferentes propiedades fisicoquímicas en comparación con los macromateriales. En medicina, las NP de Selenio (NPs de Se) se utilizan como agentes antibacterianos, antioxidantes y anticancerígenos. Su uso en agricultura ha mostrado una amplia gama de ventajas potenciales como agentes antimicrobianos, promotores de crecimiento, biofortificación de cultivos y nutraceuticos, además de mostrar menor toxicidad en plantas que el uso de otras formas inorgánicas de Se, lo que los convierte en una alternativa (Formagio et al., 2014; Feng et al., 2015). Por ello, en este proyecto se evaluó el efecto de la aplicación foliar de NPs de Se en

Festuca arundinacea sobre las características fenológicas, composición fisicoquímica, - compuestos bioactivos (Fenoles, flavonoides y taninos), actividad antioxidante y translocación de selenio, además de evaluar la digestibilidad *in vitro* para identificar el comportamiento específico de los parámetros de fermentación ruminal de *F. arundinacea* Schreb. y cuantificar la producción de gas total y CH₄ así como la liberación de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides, taninos) de forrajes enriquecidos con 0, 1,5, 3,0 y 4,5 ppm de NPs de Se.

2. JUSTIFICACIÓN

Los forrajes son la columna vertebral de la agricultura sostenible y contribuyen en gran medida a la economía mundial ya que se estima que la superficie de pastizales es el doble que la de las tierras de cultivo. Las gramíneas forrajeras ocupan más superficie terrestre que cualquier otro cultivo y tienen un valor incalculable para la alimentación del ganado, especialmente de los rumiantes (Chen et al., 2003). En la nutrición animal, los minerales constituyen un factor fundamental de los nutrientes requeridos, tal es el caso en los rumiantes, los cuales desde hace muchos años han sido objeto de distintas investigaciones, en especial los macrominerales (Ca, P, Mg, K y Na) y algunos oligoelementos como el Cu, Co, I, Zn y Se (Underwood, 2012). El selenio (Se) es un oligoelemento importante para las funciones biológicas, donde se requieren de 40 a 700 µg por día, es decir el Se es un componente estructural de más de 30 selenoproteínas siendo un mineral involucrado en distintos procesos bioquímicos para la vida. De acuerdo con lo anterior, el Se en micro cantidades tiene funciones muy importantes, por lo que la deficiencia de este elemento en los animales está asociado a distintas alteraciones en el organismo, tal como decrementos en fertilidad, abortos durante la gestación, retención de placenta y debilidad neonatal. (Bribiesca, J., Casas, R., & Pérez, A., 2018). Por lo tanto, el suplemento de Se en rumiantes es de suma importancia ya que el ciclo de Se en la cadena alimenticia de los animales terrestres comienza desde el suelo e influye en el desarrollo de las plantas. La principal fuente de Se para las plantas es el suelo y se transfiere a los animales que las consumen, por lo que la concentración de Se suelo y plantas varía significativamente (Surai & Taylor., 2008). La intervención agrícola que mejora los niveles de Se en las plantas cultivadas se ha definido como biofortificación, considerada como una estrategia complementaria para mejorar la nutrición humana y animal (Bamberg et al., 2019). Si bien, la incorporación de Se de forma edáfica es una alternativa, varios factores influyen en la acumulación de Se en las plantas, incluida la concentración, tipo de Se, pH, potencial redox, concentración de iones competidores en el suelo, además de los factores vegetales (actividad transportadora de la membrana o los mecanismos de translocación) que intervienen en la tasa de absorción del elemento en la planta (Kikkert & Berkelaar,

2013). Dentro de la veterinaria y la zootecnia, el interés por reducir las deficiencias de Se en rumiantes ha consistido en suministrar Se en sus dietas en forma de sales inorgánicas, como el selenito de sodio y el selenato de sodio. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el Se inorgánico no se trasloca adecuadamente, a diferencia del Se orgánico que presenta una mayor asimilación en estos animales (Kumar et al., 2009)

Esta investigación puede en primera instancia, promover la biofortificación foliar de los cultivos con nanopartículas (NP) de Se para enriquecerlos con este oligoelemento para evitar las problemáticas que generan en el ganado por la ausencia de este elemento. Además, con base a la literatura, utilizar la biofortificación foliar con NP para obtener los beneficios que este oligoelemento puede generar a nivel fenológico y fisicoquímico en los cultivos como el desarrollo de raíz y hojas, además de la síntesis de algunos compuestos con actividad antioxidantes. Por otra parte, los resultados de este estudio en la evaluación de la digestibilidad *in vitro* de Festuca enriquecido con NP de Se pueden mejorar su rendimiento y las variables de fermentación.

3. MARCO TEORICO

3.1 Rumiantes

Los rumiantes son animales que comprenden alrededor de 250 especies distribuidas por todo el mundo en forma domesticada y salvaje, se encuentran en grandes pastizales y se trasladan a distintos lugares en busca de nuevos y frescos pastos. Muchas especies de este grupo tienen cuernos y no poseen caninos ni incisivos superiores (SIAP, 2017). Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pastos y forrajes, ya que pueden degradar los hidratos de carbono estructurales, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digeribles para especies no-rumiantes o de estómago simple (Gutiérrez, 2015)

3.2 Fisiología animal

Los mamíferos clasificados como rumiantes se caracterizan por la adaptación morfofisiología de su sistema digestivo fraccionado en cuatro compartimentos (Fig. 1): I) retículo, II) rumen, III) omaso y IV) abomaso (Resende Jr et al., 2019).

Cada uno de esos compartimentos que conforman al sistema digestivo del rumiante tienen funciones específicas, tal es el caso del abomaso el cual tiene la función de liberar hidrolasas digestivas, similar al estómago de un monogástrico. Por otra parte, los rumiantes tienen la capacidad de alimentarse de materia vegetal como los pastos y los forrajes, alimentos conformados por polisacáridos estructurales tales como la celulosa, hemicelulosa y pectina. La degradación de estos compuestos se realiza gracias a los microorganismos presentes a la digestión fermentativa la cual se lleva en el rumen del animal (Wallace et al., 2017).

3.2.1 Retículo

Dentro del aparato digestivo de los rumiantes encontramos al retículo (red o redcilla). Recibe este nombre debido a la disposición en forma de red de los pliegues de su mucosa. Está situado cranealmente y se encuentra en contacto con el diafragma. Comunica con el rumen a través del pliegue retículo-ruminal, lo que los convierte en una única unidad funcional (Lozano, 2017).

3.2.2 Rumen

El rumen es un gran saco anóxico el cual presenta un caso específico de mutualismo entre el animal y los microorganismos intestinales presentes. La digestión del rumen alberga grandes poblaciones de protozoos y bacterias, las primeras son las más importantes y su concentración puede llegar a cien mil millones por centímetro cúbico (Castillo et al., 2014). La concentración y el tipo de bacterias depende de la dieta pues si bien están presentes siempre, el porcentaje en que se halla cada una de las especies es muy variable.

El ecosistema ruminal está formado por tres grupos: I) bacterias, su concentración es de 1×10^{10} a $1 \times 10^{11} \text{mL}^{-1}$ de líquido ruminal, II) protozoarios ciliados, con una concentración la cual oscila entre 1×10^4 y $1 \times 10^6 \text{mL}^{-1}$ de líquido ruminal y III) hongos, con una concentración de 1×10^3 a $1 \times 10^5 \text{mL}^{-1}$ de líquido ruminal (Arias et al., 2020).

De acuerdo con lo anterior, el rumen proporciona un ambiente estable anaerobio con temperatura promedio de $39 \text{ }^\circ\text{C}$ y pH de 6.7 (Mizrahi et al., 2021). La ausencia de aire (oxígeno) en el rumen favorece el crecimiento de especies específicas de bacterias, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (glucosa). Los microorganismos fermentan glucosa para obtener la energía para crecer y ellos producen ácidos grasos volátiles (AGV) como los productos finales de fermentación (Aydin et al., 2017). Los AGV cruzan las paredes del rumen y sirven como fuentes de energía para los rumiantes tales como los bovinos y otros animales como ovejas y cabras, cuyas dietas están compuestas principalmente de materia vegetal (Li, Sengupta & Haniga, 2019). Los rumiantes son fácilmente identificados por la rumia, aun cuando no ingieren alimentos. Esta acción es parte del proceso que permite al rumiante obtener energía de las paredes de las células de las plantas, también llamada fibra (Vargas, 2019)

3.2.3 Omaso

Es una estructura de forma esférica, la cual se ubica a la derecha de la red y posee forma esférica. Se comunica con la red por el esfínter retículo-omasal y está conformado por dos partes claramente diferenciadas, las cuales se pueden definir como el cuerpo el cual está conformado por un número variable de hojas o láminas que dirigen su borde libre hacia el canal del omaso y el canal omasal. Este último comunica con la red a través del esfínter retículo-omasal y con el abomaso por esfínter omaso-abomasal (Lozano, 2017).

3.2.4 Abomaso

El abomaso se ubica a la derecha y ventralmente en la cavidad abdominal, tiene forma de saco alargado con un extremo ciego denominado fundus y un extremo pilórico que desemboca en el duodeno. La mucosa es de tipo glandular y en el fundus presenta pliegues que aumentan su superficie (Relling & Mattioli, 2003).

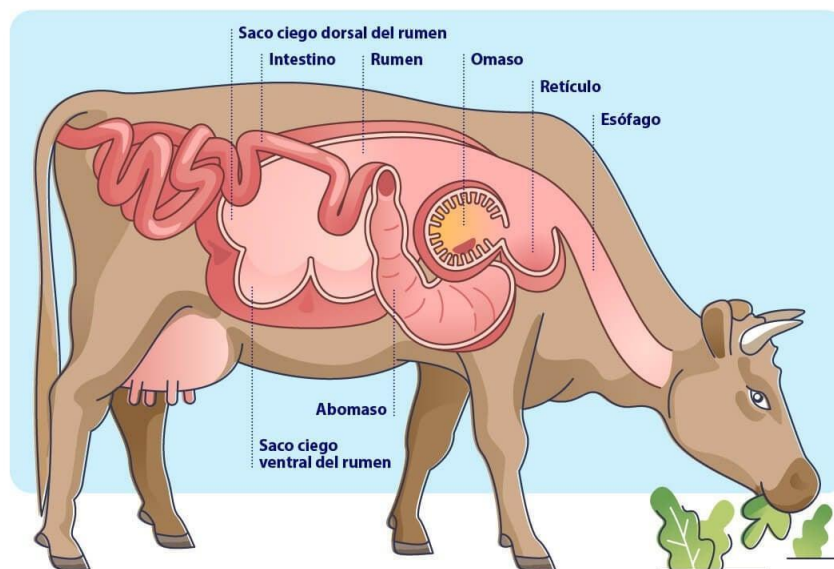


Fig. 1. Aparato digestivo de los rumiantes

3.3 Fermentación anaerobia del rumen

Los rumiantes emiten CH₄ y CO₂ a la atmósfera, principalmente a partir de la fermentación de carbohidratos solubles y estructurales (Teklebrhan et al., 2020). Estos gases de efecto invernadero (GEI) favorecen el cambio climático y su concentración cada vez mayor en la atmósfera también acelera el calentamiento global (Olesen et al., 2006). El CH₄ es uno de los tres principales gases de efecto invernadero, junto con el CO₂, su potencial de calentamiento global es 25 veces mayor que el del CO₂ (Broucek, 2014). Por ello, se han desarrollado diversas estrategias para reducir su emisión, como el uso de modificadores metabólicos, la adición de aceites esenciales y compuestos bioactivos de leguminosas tropicales, entre otros. Sin embargo, las metodologías validadas para medir con mayor precisión las emisiones de GEI de los rumiantes suelen disminuir el consumo de materia seca (Sánchez et al., 2018). El Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático sugiere el uso de sus directrices para estimar la emisión de CH₄ de la fermentación entérica en rumiantes, y recomienda generar factores de emisión teniendo en cuenta la composición química del sustrato y sus productos de fermentación para aumentar la precisión. La digestión anaeróbica y la técnica de producción de gas *in vitro* se han utilizado ampliamente para evaluar la degradación de sustratos y productos de fermentación. Por lo tanto, estas técnicas también pueden utilizarse para generar factores de emisión de GEI y pueden ser otra alternativa frente al calentamiento global.

3.3.1 Síntesis de ácidos grasos volátiles en rumiantes

Los carbohidratos más abundantes en la dieta de los rumiantes son los polisacáridos (Celulosa, hemicelulosa, pectinas, fructanas y almidones), sin olvidar la importancia de las proteínas en su dieta, siendo estas macromoléculas aquellas que pueden contribuir a la producción de ácidos grasos volátiles al igual que la hidrólisis de las grasas las cuales liberan el glicerol que también da origen a los

ácidos grasos volátiles (AGV). (El-Shazly, 19522; Manaha, 1964; Pérez, 2006; Araiza et al., 2022).

3.3.1.1 Ácido acético

Las reacciones fosfoclasticas son las predominantes para la síntesis de este ácido, dichas reacciones consisten en las que el ácido pirúvico es convertido en fosfato de acetilo y ácido fórmico o hidrogeno y CO₂. Los hidrógenos que se liberan durante el proceso oxidativo son utilizados por los diferentes microorganismos presentes como las propionibacterias que al oxidar el ácido pirúvico.

3.3.1.2 Ácido propiónico

Este ácido se origina a partir del ácido pirúvico o del láctico en el rumen, el cual puede seguir dos rutas diferentes, si bien las dos rutas son funcionales, una de ellas se manifiesta predominante y se lleva a cabo con la formación de oxaloacetato y succinato. La segunda ruta requiere de compuestos como la síntesis de acrilato y es manifestada en el rumen cuando los animales en su dieta carecen de azufre.

3.3.1.3 Ácido butírico

En el rumen del animal puede sintetizarse este ácido graso a partir de ácido acético o de sustancias capaces de formar acetil-CoA, como el ácido pirúvico.

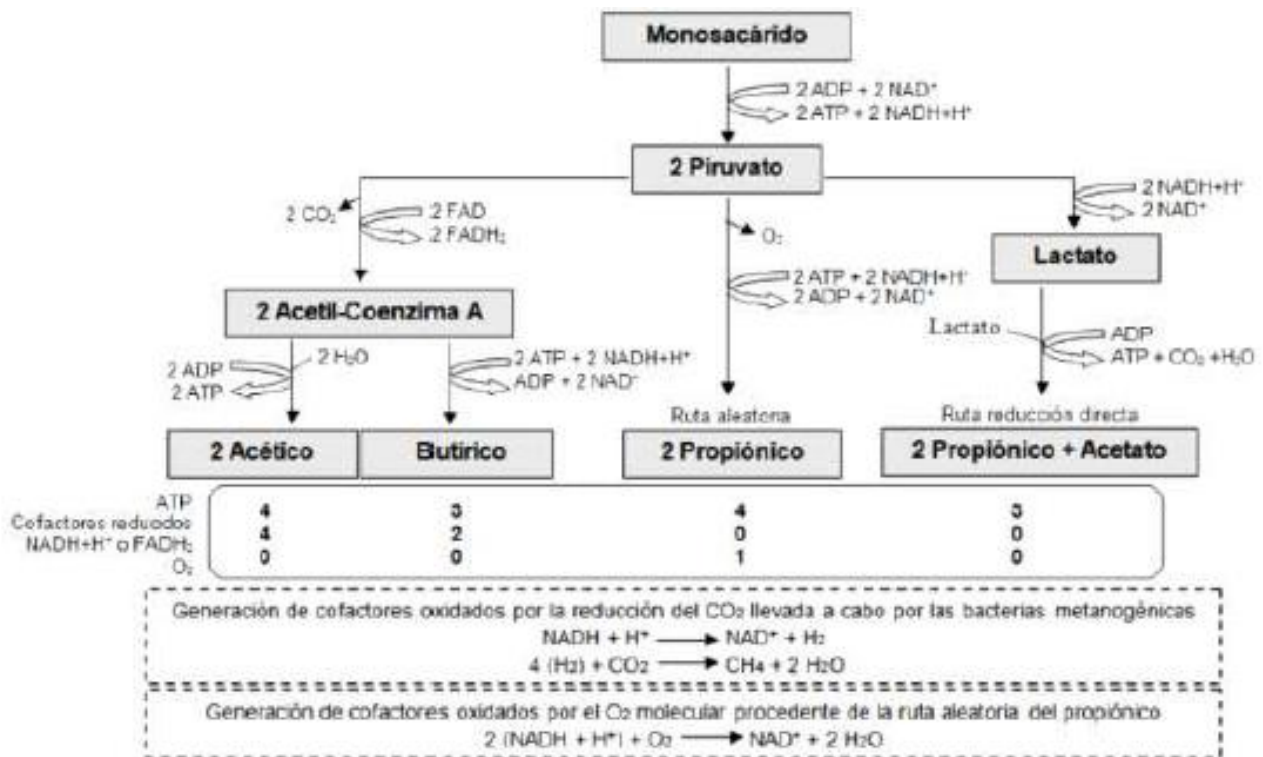


Fig. 2. Síntesis de ácidos grasos volátiles a partir de monosacáridos en el rumen.

3.4 Emisiones de gases de efecto invernadero

La ganadería se enfrenta al reto de satisfacer la demanda de alimentos debido al crecimiento de la población mundial, cuyas previsiones son cerca de 10 mil millones de personas en 2050 (FAO, 2017).

Las expectativas para cumplir con este reto son altas, pero para ello se requiere una producción ganadera más eficiente y con menos emisiones contaminantes, tanto de gases de efecto invernadero como de sustancias que contaminen suelos y aguas. En cuanto a los gases de efecto invernadero, el CH₄ tiene un potencial de calentamiento entre 23 y 25 veces superior al CO₂ y una vida media en la atmósfera que oscila entre 10 y 20 años. Además, este gas supone una pérdida de hasta el 12 % de la energía ingerida por los rumiantes (Gerber et al., 2013) a través del CH₄ entérico (94 %). Por ello, se buscan estrategias para manipular la fermentación

entérica y reducir las emisiones de CH₄ sin perjudicar la cantidad y calidad de los productos pecuarios (Carro et al., 2018).

3.4.1 Producción de metano en el rumen

La mayor producción de CH₄ entérico se genera en el rumen (85-95 %), el resto en el intestino grueso del animal. El CH₄ es producido por las arqueas metanogénicas y se forma a partir de los productos resultantes de la fermentación de la materia orgánica de los alimentos (Carro et al., 2018). La mayoría de las arqueas genera CH₄ a partir de CO₂ e hidrógeno, siendo minoritarias las que producen CH₄ por reducción del ácido acético (CH₃ COOH → CH₄ + CO₂). Por otra parte, la dieta del rumiante es muy importante debido a que los ácidos grasos libres, específicamente los insaturados, demuestran tener un efecto inhibitorio sobre las arqueas, protozoos y algunas especies bacterianas, especialmente las bacterias fibrolíticas, por lo que niveles altos de grasa en la dieta reducen la producción de CH₄ y la digestibilidad de la fibra. La acción negativa de los ácidos grasos libres suele ser mayor con dietas concentradas que con dietas forrajeras, ya que provocan un bajo pH ruminal (Vargas et al., 2012).

3.5 Pastos y forrajes

En el trópico de México, la ganadería se realiza principalmente bajo pastoreo de gramíneas nativas y gramíneas introducidas. La asociación de gramíneas y leguminosas mejoran el desempeño del ganado y la productividad del potrero. Un **forraje** se define como cualquier gramínea o leguminosa cosechadas para ser suministradas como alimento a los animales, sea verde, seco o procesado los cuales pueden tener distintas características nutricionales (heno, ensilaje, rastrojo) (Marmol, 2006; INATEC, 2016).

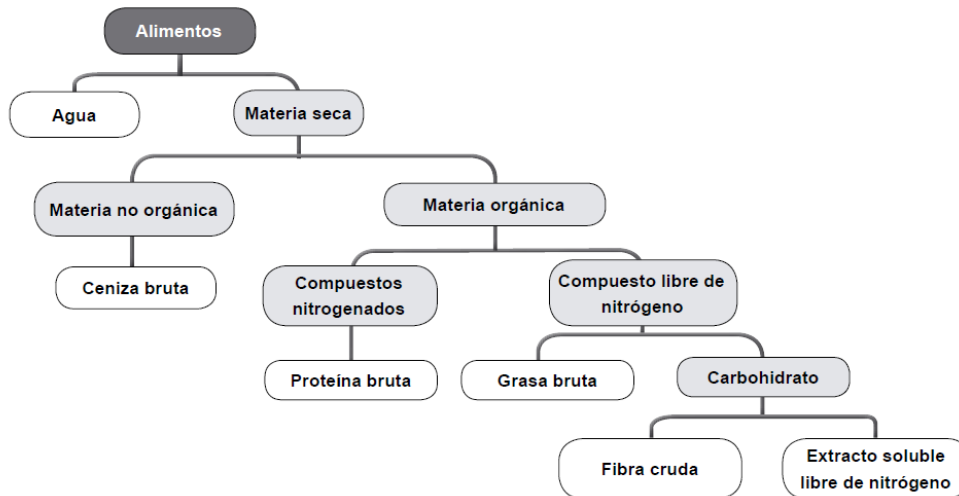


Fig. 3. Composición química de los forrajes.

3.5.1 *Festuca arundinacea* Schreber

El pasto *Festuca arundinacea* Schereb es una planta perenne de 45 a 180 cm, la cual se caracteriza por tener hojas con limbo plano y nervios salientes, y pueden alcanzar hasta 1 cm de anchura. Presenta una inflorescencia en panícula, erecta o también curvada. El *Festuca* presenta una gran adaptación a las condiciones climáticas y edáficas adversas ya que presenta buena tolerancia al frío, calor y a la sequía. Se desarrolla mejor en sustratos calizos y arcillosos, con poca exigencia en fertilidad

El *Festuca arundinacea* presenta características que lo hacen de interés forrajero. El rendimiento promedio es de 10 ton MS/ha/año. Entre las gramíneas perennes, *Festuca arundinacea* presenta un mayor crecimiento primaveral, produce en verano y rebrota en otoño

3.6 Nanotecnología

La nanotecnología (NT) es un área de investigación científica multidisciplinaria que trabaja básicamente en el diseño, caracterización, fabricación y aplicación de estructuras y constituyentes, y se crea mediante la manipulación controlada del tamaño y la forma a escala nanométrica (átomo y molecular, menos de 100 nm)

produciendo estructuras, componentes y sistemas con al menos una característica o características nuevas o propiedades superiores (Mydin et al., 2020; Hulla et al., 2015). La palabra nanotecnología fue utilizada por primera vez en 1974, por el profesor de la universidad de ciencias en Tokyo, Norio Taniguchi, con el objetivo de explicar la técnica de producción de materiales en tamaños nanométricos, donde se involucran procesos de separación, consolidación y deformación de los materiales con la ayuda de un átomo o solo una molécula (Risk, 2014). La NT ha evolucionado a través del tiempo mediante la aportación interdisciplinaria de ideas y propuestas emanadas de la biología, química, física, ingeniería y la medicina; donde se conjuntan estrategias que están permitiendo diseñar, sintetizar y fabricar materiales (Lira et al., 2018). El interés sobre especies químicas de tamaño nanométrico es una de las áreas de trabajo más importantes de la investigación en química debido, fundamentalmente, a la gran variedad de nuevas propiedades y potenciales aplicaciones que se pueden explotar en diversos campos (Oroz, 2009). Esta escala de tamaño corresponde las denominadas nanopartículas, estructuras con dimensiones similares en tamaño a muchas moléculas biológicas, pueden ser de metales, de óxidos metálicos, compuestos orgánicos o metaloides con propiedades biológicas, catalíticas, etc. que, en general, se relacionan con el tamaño y la forma de los nuevos materiales y pueden ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica, las cuales han demostrado ser de gran utilidad en aplicaciones relacionadas con la salud, la tecnología, la alimentación, medioambiente o en la agricultura (Moreno, 2022)

3.6.1 Clasificación de la nanotecnología

La nanotecnología (NT) se divide en dos tipificaciones, según la técnica de aplicación: 1) Técnicas de *arriba hacia abajo* (*Top-down*) y 2) técnicas de *abajo hacia arriba* (*Bottom up*) (Zanella, 2012). En el caso de la NT *Top-down*, se trata de diseñar y miniaturizar el tamaño de estructuras para obtener a nanoescala sistemas

funcionales. Por otra parte, en el caso de la NT *Bottom-up*, se centra en la construcción de estructuras y objetos más grandes a partir de sus componentes atómicos y moleculares. El tipo *Bottom-up* es acogida como el enfoque principal de la NT ya que permite que la materia pueda controlarse de manera extremadamente precisa (Quintili. 2002).

3.6.2 Diversos productos en nanotecnologías

Con el avance de la ciencia y el desarrollo de nuevas investigaciones en las distintas áreas de estudio, surge la versatilidad de implementar la NT en las distintas áreas. Esto posibilitó el desarrollo de diversos nanomateriales, nanopartículas y diversas hipótesis futurísticas, que cada día dejan de ser hipotéticas. Debido a lo anterior, estos estudios tienen como resultado grandes beneficios a la sociedad, a la industria y al medio ambiente. Existen diversos campos de aplicación de la NT los cuales dependerán directamente de la forma, procedimiento y fin para lo que se da la manipulación de la materia en la escala nano. Estos materiales utilizados son llamados nanomateriales, los cuales pueden obtenerse del medio ambiente con sus características naturales o pueden ser generados de forma sintética a los cuales se les atribuye características especiales.

3.6.2.1 Nanoalambres:

Se definen como nanoestructuras en forma de filamento, los cuales son considerados semiconductores nanoestructurados cuyas propiedades resultantes mejoran el desempeño en comparación con el sustrato original. Los nanoalambres pueden estar recubiertos de receptores biológicos específicos a determinado tipo de microorganismos y/o sustancias que al encontrarse inmerso en un medio celular puede variar su conductividad eléctrica al reconocer el agente de acuerdo al tipo de receptores en su superficie (Lira et al., 2018; Gutiérrez, 2022)

3.6.2.2 Nanobombas

Son conglomeraciones de nanotubos de carbono recubiertos de anticuerpos a escala nanométrica, que una vez expuestos a la luz y al calor resultante, son

incapaces de disipar la energía concentrada y se produce una especie de explosión (Quintili, 2012).

3.6.2.3 Nanotransportadores

Son estructuras biocompatibles para aplicaciones biomédicas y biotecnológicas. Lo que facilita la capacidad de dirigir con precisión un fármaco a la localización deseada en el cuerpo, tal como la de órganos particulares o células específicas (Serrano, 2018).

3.6.2.4 Nanopartículas

Las nanopartículas (NP) se consideran los componentes básicos de la NT y se refieren a partículas con al menos una dimensión < 100 nm (Kreylin et al., 2010). Los suelos son un depósito de muchas NP naturales y de ingeniería provenientes de muchas aplicaciones industriales y ambientales, y esto ha originado discusiones sobre su efecto en los sistemas biológicos, especialmente en la salud humana y sobre su papel en los procesos geoquímicos o en la agricultura (Smith, 2007; Medina et al., 2019)

3.7 Aplicaciones de nanopartículas en la agricultura

La ciencia aplicada en los sistemas agrícolas presenta una serie de adversidades y de una gran gama de desafíos como bajo rendimiento de los cultivos, baja eficiencia en el uso de macro y micronutrientes, la deficiente materia orgánica del suelo, carencias multinutricionales, cambio climático, reducción de la disponibilidad de tierras cultivables, así como la escasez de agua y mano de obra para el campo (Smith, 2007). Respecto al sector agrícola, diversos experimentos se han realizado para conocer el tamaño óptimo, forma y concentración de las NP para que sean aplicadas a las plantas tratando de mejorar su penetración y translocación vascular por los haces vasculares del xilema y floema.

El uso de concentraciones o dosis menores a 5 ppm de NP pueden promover mayor crecimiento de las plantas. El tamaño de las NP es un factor relevante el cual interviene en la acción de su penetración y translocación en el interior de los tejidos vegetales, por lo tanto, a mayor tamaño de NP menor será la penetración en el sistema vascular en las plantas cuando se utilizan técnicas de aspersión foliar (Adhikari, Kundu & Rao, 2016). Las NP pueden penetrar los tejidos vegetales cuando se aplican sobre las hojas de las plantas en forma de aerosol o aspersión.

Existe evidencia que 14.7% del nanomaterial aplicado a las plantas se pierde al usar la técnica de aspersión o aerosol, en comparación con la pérdida de 32.5% o más con los productos agrícolas convencionales aplicados de manera tradicional. La aspersión foliar para el uso y manipulación de los materiales en una escala nano pueden penetrar fácilmente al interior de las plantas mediante la apertura de los estomas, los cuales tiene tamaños micrométricos fluctuando en el rango de 10 μm a 60 μm (Hawthorne et al., 2014; Fricker & Wilmer, 2012).

3.8 Selenio y nanopartículas de Selenio

El Se es un oligoelemento traza escaso en la corteza terrestre de origen volcánico que se encuentra en los terrenos arcillosos. Es un subproducto de la fabricación industrial del azufre y del ácido sulfúrico. Químicamente forma con el hidrógeno y el oxígeno los mismos compuestos que el azufre H_2SeO_4 , H_2SeO_3 , H_2Se , SeO_2 . Puede también ocupar el lugar del azufre en ciertos aminoácidos (cistina, metionina) (Acosta, 2007). El Se es un elemento que se encuentra en forma constante, pero en pequeñas cantidades en los tejidos animales. Investigaciones de tipo bioquímico, ubican el Se como uno de los micronutrientes esenciales para los animales y muy importante para la nutrición animal (Bentancur et al., 2015). El Se es importante debido a que es esencial para formar proteínas y ser cofactor de enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa (GPX), la cual tiene como función reducir las especies reactivas al oxígeno (ERO). La carencia de Se en los mamíferos provoca deficiencias fisiológicas y nutricionales además de patologías ya que el Se forma al menos 25 selenoproteínas que cumplen funciones antioxidantes, antivirales y antitumorales (Garduño et al., 2018; Gaucin et al., 2021). La síntesis y aplicación de NP de Se presenta varias ventajas, incluida la estabilidad química, la biocompatibilidad, la baja toxicidad, aumentar la bioactividad, mejorar la orientación y proporcionar medios versátiles para controlar el perfil de liberación

3.9 Biofortificación de NP en plantas

El proceso de aumentar el valor nutricional de los cultivos alimentarios al incrementar el contenido de vitaminas y minerales; esta acción es denominada como biofortificación agronómica. La biofortificación implica la aplicación de distintos minerales o nutrientes de forma foliar o edáfico, aprovechando el manejo de la planta, sus características, y los factores del suelo para obtener un mayor contenido de micronutrientes clave en la porción comestible (Latina & Caribe, 2019)

3.9.1 Biofortificación de plantas con nanopartículas de selenio

La importancia del Se en la nutrición vegetal se conoce desde hace mucho tiempo. Cada vez hay más formas de usar NP de Se (Lo definiste así en la página anterior) en el campo de la agricultura, forma edáfica (adición de Se al suelo), el cultivo hidropónico y foliar en las plantas. Las plantas pueden beneficiarse del uso de NP de Se en una variedad de aplicaciones, que incluyen (1) cuidado y manejo de plagas y enfermedades provocadas por microorganismos infecciosos como bacterias y hongos, (2) como oligoelementos casi esenciales, a través de la promoción de las vías bioquímicas de las plantas y, por lo tanto, refinando el progreso, el rendimiento y el valor nutricional de los cultivos, (3) biofortificando las cosechas usando Se para aumentar su contenido, (4) aliviando el estrés abiótico y (5) aumentar la calidad nutracéutica de los alimentos consumibles (Garza et al., 2021).

3.9.2 Absorción de NP de Se en las plantas

En relación con la fitocaptación de NP de Se y su translocación, la determinación de la seguridad y la toxicidad de las NP provoca una comprensión profunda de su absorción en las plantas. Existen diferentes formas de que la planta capte este oligoelemento en forma de NP. Un mecanismo de absorción de las NP de Se ocurre a través de la pared celular y penetración de la membrana plasmática. Solo las NP con tamaños menores a los 100 nm pueden ingresar por los distintos poros (estomas) y atravesar la pared celular con éxito. La pared celular de la planta actúa como una barrera, evitando la entrada de sustancias o materias externas, incluidas las NP, en las paredes celulares de la planta. (Hu et al.,2018; Carpita et al., 1979) Se ha demostrado que las NP pueden adherirse a superficies como a las raíces de las plantas y podrían influir en la absorción química y física en las plantas (Hu et al.,2018). Una de las explicaciones que mayor solidez científica demuestra es la translocación de los nanomateriales los cuales pueden moverse intracelular y extracelularmente entre los tejidos vegetales hasta llegar al xilema (Rajaei et al., 2020). Una vez que las NP están dentro del sistema vascular de la planta, podrán

transportarse a las partes aéreas junto con la transpiración del agua de la planta y el flujo nutricional en la transmisión de nutrientes.

3.10 Uso de nanoelementos en Nutrición animal

La NT También hay muchos dobles espacios entre palabras en este y el siguiente párrafo) y sus aplicaciones tiene la capacidad de revolucionar la producción agropecuaria. Esta tecnología ha tenido diversas aplicaciones en producción animal, donde incluyen el uso de nuevas herramientas moleculares y celulares para la reproducción animal, preservación de la identidad del animal desde el nacimiento hasta la mesa del consumidor (“trazabilidad”), bioseguridad de los alimentos de origen animal, mejor comprensión de los fenómenos que rigen la nutrición animal desde la ingestión de la dieta hasta la captación y utilización de los nutrientes y otras (Scott, 2007).

En la nutrición animal al igual que en otras áreas es posible aplicar la NT, con el objetivo de obtener información de un nutriente o componente bioactivo y su liberación en sitios específicos de acción, mayor disponibilidad, mantenimiento de niveles adecuados por periodos más largo de tiempo, mayor aprovechamiento del alimento (Ross et al., 2004). Los minerales son uno de los suplementos más ampliamente utilizados en nutrición animal; sin embargo, la forma en la cual se encuentran dichos minerales influye en la biodisponibilidad de los mismos, por lo que si son de baja biodisponibilidad, el animal no los aprovechará correctamente y se eliminarán. Un ejemplo es el Selenio (Se) un oligoelemento esencial con un margen estrecho entre los efectos benéficos y tóxicos. Recientemente el nanoselenio ha atraído la atención de muchos investigadores debido a su elevada biodisponibilidad y baja toxicidad, porque las partículas nanométricas exhiben características novedosas, tales como una mayor superficie de contacto, y elevada actividad superficial, una gran capacidad de absorción y baja toxicidad.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las NPs de selenio en las características fisicoquímicas, fisiológicas y morfológicas de un forraje (*Festuca arundinacea*) así como en su fermentación *in vitro*.

4.2 Objetivos específicos

- Conocer el efecto de la fertilización foliar con NP de Se en los parámetros fenológicos (tamaño de raíz, longitud del pasto y producción de biomasa) del pasto *Festuca arundinacea* Schreber.
- Analizar las características fisicoquímicas del pasto *Festuca arundinacea* Schreber biofortificado con NP de Se y su impacto en sus características nutricionales a través de los métodos analíticos de la AOAC.
- Evaluar el contenido de compuestos fenólicos (fenoles, flavonoides y taninos) en pasto *Festuca arundinacea* Schreber biofortificado con distintas concentraciones de NP de Se para determinar la capacidad antioxidante por los métodos de ABTS y DPPH.
- Evaluar la traslocación de Se en pasto *Festuca arundinacea* Schreber biofortificado foliarmente con NP de Se para determinar su concentración de Se.
- Evaluar la digestibilidad *in vitro* del pasto *Festuca arundinacea* Schreber bioortificado foliarmente con NP de Se y su efecto en la producción de gas y variables fermentativas

4.3 Hipótesis

La biofortificación foliar de nanopartículas de selenio en *Festuca arundinacea* Schreber mejora sus propiedades fisicoquímicas y fenológicas generando un impacto positivo en su desarrollo, sin efectos negativos durante su fermentación *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del experimento

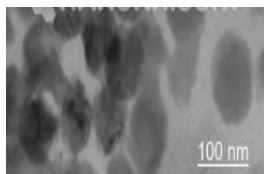
El experimento se realizó bajo condiciones controladas en un invernadero cubierto de polietileno localizado en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo ubicado geográficamente entre los paralelos 20°03'37'' latitud Norte y 98°22'55'' longitud Oeste.

5.2 Obtención de la semilla *Festuca arundinacea* Schreber y nanoparticulas de Selenio

La semilla de pasto *Festuca arundinacea* Schreber se adquirió del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Celaya, México). La pureza fue del 99.5 % y la capacidad de germinación del 98%. Las Nanopartículas de Selenio con un tamaño <50 nm se adquirieron en la empresa ID-nano Investigación y Desarrollo de Nanomateriales, S.A de C.V (Tabla 1).

Tabla SEQ Tabla * ARABIC 1. Características fisicoquímicas de las nanopartículas de selenio utilizadas para la fertilización foliar del pasto (*Festuca arundinacea* Schreb.) en un experimento de invernadero de 90 días

Formula química	Se
Color	Gris
Densidad (g/cm ³)	4.81
Peso molecular	78.96 U
Punto de fusión	960.8 °C
Punto de ebullición	222.12 °C
Propiedades magnéticas	Débilmente ferromagnético
Tamaño de partícula	< 100 nm
Morfología	Esféricas



5.3 Germinación y método de siembra

Para la germinación de la semilla de *Festuca arundinacea* se utilizó suelo del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (Estado de Hidalgo, México) de las áreas de cultivos rotados. Las coordenadas geográficas fueron latitud norte 20°04'53" y latitud oeste 98°22'07" del meridiano de Greenwich. Según el sistema de clasificación de suelos de la FAO/UNESCO, el suelo es feozem háplico con pH 7.54 y conductividad electrolítica de 5.3 dS/m⁻¹, capacidad de retención de agua (WHC) de 625.01 g/kg⁻¹, 3.6 g C kg⁻¹ de carbono orgánico y 0,21 g N kg⁻¹ de N inorgánico. La temperatura durante el experimento fue 25 a 28 °C durante el día y 16 a 19 °C por la noche en el periodo de mayo a septiembre de 2020. La densidad de siembra fue 40 kg/ha mediante boleadora manual y se realizó por triplicado.

5.4 Aplicación foliar de las nanopartículas de Selenio

La biofortificación con NPs de Se en el pasto *Festuca arundinacea* Schreb se realizó mediante aplicación foliar siguiendo la metodología propuesta por López-Vargas (2018), utilizando 0, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm. La aplicación se realizó 21 días después de

la germinación de la semilla, y se establecieron tres tiempos de cosecha durante 90 días.

5.5 Análisis morfológicos en pasto *Festuca arundinacea* Schreber

En 10 plántulas por repetición para cada tratamiento se midió el tamaño de raíz y longitud del pasto con un vernier digital de precisión métrica. Posteriormente se cosechó y la biomasa verde se pesó con una balanza Ohaus Scout® (2,200 precisión 0.01 g).

5.6 Acondicionamiento de la muestra

La biomasa verde se deshidrató en una estufa de secado con flujo de aire a una temperatura máxima 60°C por un periodo de 72 horas. Posteriormente se molieron (pulverizador de turbina (Pulverizador Weg, México) y pasaron a través de malla de 2 mmø. Las muestras fueron almacenadas en oscuridad y en bolsas de plástico herméticas hasta sus posteriores análisis.

5.7 Caracterización fisicoquímica del pasto *Festuca arundinacea* Schreber

5.7.1 Humedad

La determinación de humedad se realizó mediante el método gravimétrico de secado por estufa que consiste en pesar 5 g de muestra en una pequeña charola de aluminio a peso constante. Las muestras se colocaron en horno de secado (CRAFT®- HFA-1000 DP) a 120 °C por 8 h. Posteriormente, se colocaron en un desecador por 30 min y finalmente se pesaron. (AOAC, 2000). Los resultados se calcularon de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ Humedad} = (B - A / PM) * 100$$

Donde:

B: Peso de la charola con la muestra

A: Peso de la charola con la muestra seca

PM: Peso de la muestra

5.7.2 Cenizas

Se utilizaron 5 g de muestra, se colocó en un crisol sobre un triángulo de porcelana y un tripie de acero, luego se incineraron con un mechero. Posteriormente, los crisoles se metieron en una mufla (FELISA®-FE-361) durante 4 h a 550 °C, luego se colocaron en un desecador para enfriarse y después se pesaron (AOAC, 2000). Los resultados se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de Cenizas} = (B - A / PM) * 100$$

Donde:

B: Peso del crisol con cenizas.

A: Peso del crisol vacío

PM: Peso de la muestra g

5.7.3 Proteína

Se utilizó el método MicroKjeldahl, la técnica se basa en la digestión de la materia orgánica con H₂SO₄ concentrado, CuSO₄(H₂O)₅ y K₂SO₄, formando (NH₄)₂SO₄ que en exceso de NaOH libera NH₃, el cual es destilado y captado en una solución de ácido bórico. Se utilizaron 0.5 g de muestra y se colocaron en un matraz Kjeldahl donde se adicionaron 15 mL de H₂SO₄ concentrado y 5 g de mezcla digestora (20 g de CuSO₄(H₂O)₅ y 200 g de K₂SO₄). Los matraces se colocaron en el Micro-Kjeldahl (Büchi. Model b-426) y se digirieron durante tres horas. La digestión se realizó en parrillas de calentamiento conectadas a una campana de extracción de humos. A partir de que la muestra digerida cambió de negro a verde se calentó por una hora. Después se destiló con NaOH 25% [p/v], el destilado se captó en ácido bórico al 2%

y se tituló con H₂SO₄ al 0.1 N. para obtener la concentración total de nitrógeno (AOAC, 2000). El porcentaje de nitrógeno se calculó usando la siguiente formula:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{V1 - V2 * N * 0.014}{PM} * 100$$

Donde

V1: mL problema de H₂SO₄ gastado en la titulación

V2: mL blanco de H₂SO₄ gastado

N: Normalidad del H₂SO₄

PM: Peso de la muestra en g

$$\% \text{ de Proteína: } (\% N)(6.38)$$

El 6.38 es el factor de conversión utilizado para determinar el contenido proteico en forrajes y 0.014 corresponde a los miliequivalentes de N.

5.7.4 Extracto etéreo

Se utilizó 0.5 g de materia seca, y se sometió a una extracción con éter de petróleo o éter etílico, libre de peróxidos o mezcla de ambos. Se utilizó el método Soxhlet y un sistema de extracción Büchi, modelo BUL36681 con vasos Büchi y cartuchos de celulosa en los que se colocaron las muestras secas . Los vasos se colocaron en el sistema de extracción de grasa añadiendo 90 mL de solvente para lograr las descargas correctamente por 4h consecutivas. Después del tiempo de extracción fueron retiradas las muestras del equipo y se dejaron por 1h en un desecador para permitir la volatilización del solvente presente en las muestras (AOAC, 2000) Por último, se calculó el porcentaje de grasa con la siguiente formula.

$$\text{Extracto etéreo} = \frac{B - A}{PM} * 100$$

Donde:

B: Peso del vaso Büchi con grasa

A: Peso del vaso vacío

PM: Peso muestra.

5.7.5 Fibra cruda

La fibra cruda es la pérdida de masa que corresponde a la incineración del residuo orgánico que queda después de la digestión con soluciones de ácido sulfúrico e hidróxido de sodio en condiciones específicas (AOAC, 2000). Para realizar este análisis se utilizó el método gravimétrico y un determinador de fibra marca Labconco modelo LAC300001-00. Las muestras de tallo y hoja encontradas en los cartuchos de extracción de grasa fueron colocados en vasos Berzelius, añadiendo 200mL de ácido sulfúrico (0.255N), se calentó cada vaso en el aparato condensador y dejó hervir por 30min, se filtró y lavó con agua caliente hasta pH neutro, el residuo fue colocado en los vasos Berzelius, añadiendo 200mL de NaOH (0.313N) se dejó hervir por 30min, se procedió a filtrar, adicionando 25mL de ácido sulfúrico, 150mL de agua destilada y 25mL de alcohol, se colocaron en los crisoles dejándolos secar por 2h a 120°C en una estufa marca Craft, se registró el peso y posteriormente se calcino a 530 °C durante 30 min en una mufla marca Felisa modelo 3510, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Los resultados de fibra cruda se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Fibra} = \left(\frac{\text{Peso crisol con muestra seca} - \text{Peso crisol con muestra calcinada}}{\text{Peso real de la muestra}} \right) 100$$

5.7.5.2 Fibra detergente neutro

Se utilizaron bolsas ANKON (F57), con 0.5 g de muestra seca con tamaño de partícula de 2 mm la cual fue digerida por 75 minutos a 90 °C en solución detergente neutro (SDN); el cual se elaboró con 30 g de lauril sulfato de sodio ($C_{12}H_{25}NaO_4S$); 18,61 g de EDTA sal disódica dihidratado; 6,81 g de borato de sodio ($Na_2B_4O_7$); 4,56 g de fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4); 10 mL de trietilenglicol, en un L de solución. Posteriormente se colocaron 100 mL/bolsa, pH 6.9 y se adicionaron 4 mL de alfa amilasa bacteriana termoestable, actividad = 17.400 Unidades Liquefon/mL, y 20 g de sulfito de sodio anhidro por cada 24 bolsas. Las bolsas con muestra digerida se lavaron con suficiente agua hasta eliminar la solución de SDN, luego se colocaron en un recipiente con acetona por 5 minutos. Se colocaron en un desecador hasta eliminar el solvente y posteriormente se llevaron a 105 °C en una estufa con flujo de aire por 4 horas para completar el secado; el residuo en la bolsa es FDN (Van Soest, 1990).

5.7.5.3 Fibra detergente ácida

Las bolsas conteniendo FDN se digirieron durante 60 minutos a 90-100 °C en solución detergente ácida (SDA); 20 g bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB o Cetrimida) y 27.7 ml ácido sulfúrico (H_2SO_4) en un litro de solución; 100 mL/bolsa aproximadamente. Después de la digestión se lavaron las bolsas hasta pH neutro en el agua de descarte. Se eliminó el exceso de agua por presión manual y se sumergieron durante tres minutos en acetona. Se eliminó el exceso de acetona por presión y se dejaron secar a temperatura ambiente hasta su evaporación; se completó el secado a 105 °C durante 4 horas. Posteriormente, se removieron las bolsas de la estufa de secado y enfriaron a temperatura ambiente. El residuo en la bolsa de digestión es la FDA (Van Soest, 1990)

5.8 Extracción de compuestos bioactivos del pasto *Festuca arundinacea*

Se empleó la metodología propuesta por Mekam et al. (2019) con algunas modificaciones. La extracción de compuestos bioactivos se realizó agregando 10 g de muestra seca y pulverizada y 40 mL de una solución de etanol/agua (1:1) y se dejó macerar por 24 horas, con agitación mecánica (75 rpm) en oscuridad, y se centrifugó a 18510 g por 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se almacenó en tubos de 10 mL a -70 °C en total oscuridad hasta su análisis.

5.9 Fenoles totales en pasto *Festuca arundinacea*

La determinación de compuestos fenólicos totales en el extracto del forraje festuca se realizó mediante el método descrito por Pham et al. (2017). Una alícuota de 100 µL del extracto se mezcló con 500 µL de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 con agua) y se dejó reposar durante 7 minutos a temperatura ambiente; se agregaron 4 mL de solución de bicarbonato de sodio al 7% a la mezcla y se dejó reposar durante 120 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm. Se realizó una curva de calibración (Fig. 3), se utilizó ácido gálico como estándar, para expresar los resultados obtenidos como miligramos equivalentes de ácido gálico (mg EAG).

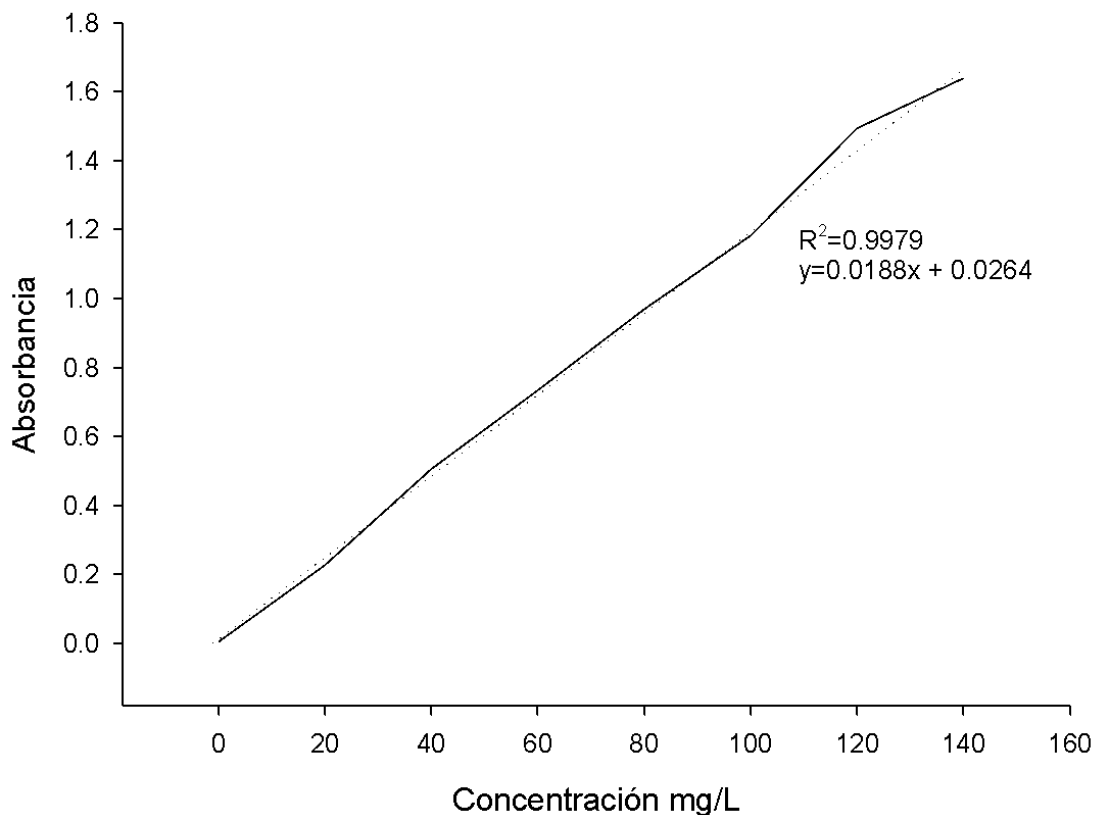


Fig. 4. Curva de calibración para estimar cantidad de fenoles totales

5.10 Flavonoides totales en pasto *Festuca arundinacea*

Para la estimación de flavonoides totales se utilizó el método descrito por Kuppusamy et al. (2018) con modificaciones. Se utilizó una solución de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 2% en metanol. Posteriormente se agregaron 2 mL del extracto y filtrado de forraje en un tubo de ensayo; se adicionaron 2 mL de $AlCl_3$, se dejó reposar durante 10 minutos; posteriormente las muestras se midieron a 415 nm. Para la cuantificar la cantidad de flavonoides se elaboró una curva de calibración (Fig. 4) utilizando como estándar quercetina para reportar los resultados como miligramos equivalentes de quercetina (mg EQ).

Quercetina

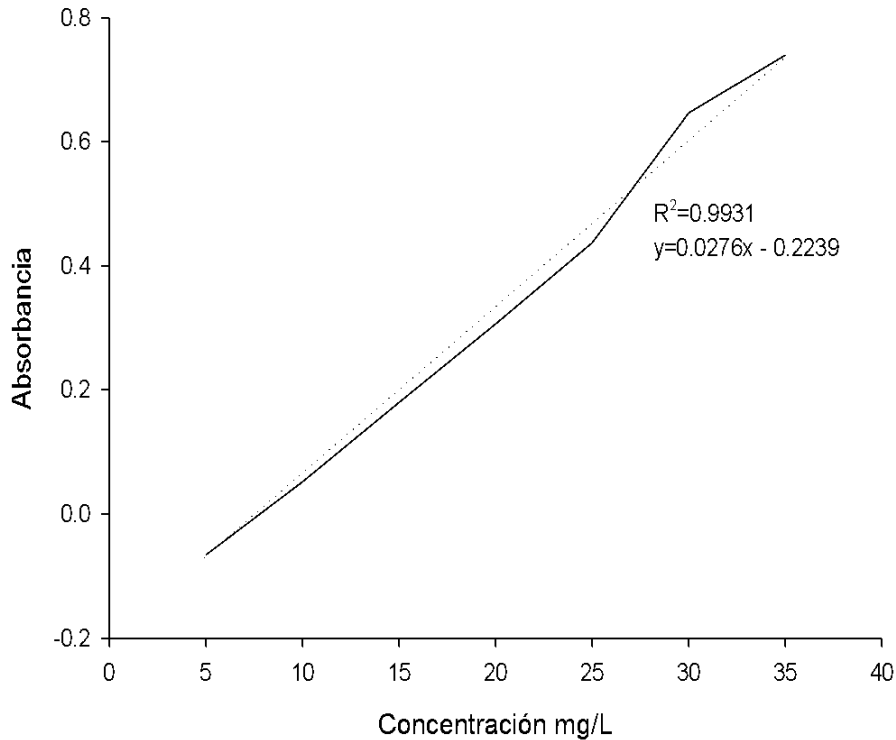


Fig. 5. Curva de calibración para cuantificar flavonoides

5.11 Taninos totales

El contenido de taninos se realizó de acuerdo con Price & Buttlar (1997) con algunas modificaciones. Se elaboró una solución de FeCl_3 0.1 M utilizando HCl 0.1 M como disolvente. Posteriormente 600 μL de FeCl_3 se agregó en un tubo de ensayo 0.5 g del pasto para forraje (control, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm), se dejó reposar por 5 min en oscuridad y después se centrifugó a 12,000 g y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se adicionó 600 μL $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 8 mM con 200 μL de sobrenadante y la mezcla se dejó reaccionar por 10 min a 22°C. La lectura de las muestras se realizó con un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway 6715, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido) a una longitud de onda de 720 nm. Se preparó un tratamiento con las mismas condiciones sustituyendo el sobrenadante de cada uno de los biodigestores con cada uno del sustrato del pasto, por el sobrenadante previamente centrifugado de un biodigestor que no contuvo sustrato, el cual se adicionó para realizar una

mezcla con una solución etanol/agua (1:1), el cual se analizó y el resultado se restó a las lecturas de los distintos tratamientos. Se elaboró una curva estándar de catequina, y los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por 100 g de muestra seca (mgEC/100 g).

5.12 Actividad antioxidante del pasto

5.12.1 Actividad antioxidante mediante la inhibición del radical DPPH

De acuerdo con la metodología de Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Se utilizó el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) y se preparó con una solución de metanol al 80% hasta obtener una concentración de 6.1×10^5 M. Posteriormente, se realizó una agitación mecánica (30 rpm) durante 120 min en total oscuridad. Para la prueba se hizo una mezcla utilizando 0.5 mL del extracto de pasto y 2.5 mL de solución de DPPH se dejó reaccionar por 60 min en la oscuridad y se leyó a 515 nm en un espectrofotómetro (Jenway 6715, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido). Se utilizó un blanco con metanol al 80% y agua, la mezcla se leyó a 515 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido ascórbico por 100 g de forraje seco (AAE / 100 g MS).

5.12.2 Actividad antioxidante mediante la inhibición del radical ABTS

Para la medición de la actividad antioxidante se utilizó el radical 2,20-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (A1888 Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE. UU.) Se hicieron reaccionar 10 mL de la solución ABTS a 7 mM con 10 mL de persulfato de potasio 2,45 mM ($K_2S_2O_8$) (216224 Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, EE. UU.). La mezcla se agitó en la oscuridad durante 16 h. El radical ABTS se ajustó con una solución de etanol al 20 % (100983 Merck®, Kenilworth, NJ, EE. UU.) a una absorbancia de 0.7 ± 0.1 y a una longitud de onda de 734 nm; posteriormente se agregaron 200 μ L del extracto a 2 mL de ABTS ajustado. La reacción se produjo durante 6 min (Nennadis et al., 2004). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido ascórbico para 100 g de forraje seco (AAE / 100 g MS).

5.13 Determinación de Selenio por espectroscopía de absorción atómica

El análisis se realizó mediante el procedimiento de digestión ácida, pre-reducción del Se y detección por espectroscopía de absorción atómica de generación de hidruros (HG-AAS), siguiendo la metodología de Smrkolj et al (2005) con algunas modificaciones. Se tomaron 2 g de forraje seco, molido y tamizado (<2 mm) los cuales se colocaron en un tubo de digestión y se añadieron 20 mL de HNO₃ concentrado calentando la mezcla a 175 °C por 60 min. Después se disminuyó a 150 °C incubándose por 90 min, se dejó enfriar y se agregaron 5 mL de una mezcla de H₂SO₄ y HNO₃ (2:1). La mezcla se calentó a 175°C por 60 min y se enfrió a 20 °C, enseguida se agregó gota a gota 2 mL de H₂O₂ y nuevamente se calentó a 140 °C por 10 min. El resultado de la digestión (blanquecino o ligeramente amarillo) se aforó a 25 mL con agua bidestilada. Posteriormente, se realizó una pre-reducción de Se⁶ a Se⁴, a 5 mL de la mezcla anterior se le agregó 5 mL 6 M de HCl y se calentó a 60°C por 120 minutos. En todos los casos se utilizó el método de adición estándar. La detección de Se en las muestras se realizó mediante un Espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer Analyst 400), equipado con atomizador de llama de aire-acetileno y lámpara de cátodo hueco de Se con ancho de rendija espectral de 2.0 nm y longitud de onda de absorción de 196 nm con generador de hidruros (Perkin.Elmer MHS-15) compuesto por una bomba peristáltica y válvula de inyección. El caudal de gas acetileno fue de 2.5 L min⁻¹ y el caudal de aire 11.5 L mín⁻¹. Los resultados se expresan como mg de Se por kg de materia seca.

5.14 Obtención del líquido ruminal

El líquido ruminal fresco se obtuvo de 2 ovinos fistulados (raza Hampshire, 56±1,4 kg de peso vivo) provistos de una cánula ruminal alimentados con no era avena henificada durante 15 días previos a la toma de muestra. El líquido ruminal se filtró con una manta cielo para eliminar las macropartículas de materia orgánica y se almacenó en un matraz con flujo continuo de CO₂ para mantener condiciones de anaerobiosis. Los ovinos fueron cuidados y alimentados respetando el protocolo del Comité Institucional de Bioética para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la UAEH en apego a los lineamientos de la Ley de protección y trato digno para los animales en el estado de Hidalgo con fundamento en las normas oficiales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM-051-ZOO-1995).

5.15 Fermentación y cinética de producción de gas *in vitro*

Para la fermentación y cinética de producción de gas *in vitro* se utilizó la técnica descrita por Theodorou et al. (1994) con algunas modificaciones. En viales serológicos con capacidad de 120 mL se agregaron 0.5 g de sustrato (control, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm) seco y molido correspondiente a cada tratamiento y 50 mL de medio de cultivo (Biodigestor). El cultivo se compuso de acuerdo con Sánchez-Santillán et al. (2015) con algunas modificaciones de una solución 1:10 de fluido ruminal fresco en buffer-mineral reducida. La solución buffer-mineral reducida contenía 150 mL de solución mineral I (6 g K₂HPO₄ (Merck®) en 1000 mL de H₂O destilada) y 150 mL de solución mineral II (6 g KH₂PO₄ (Meyer®) + 6 g (NH₄)₂SO₄ (Merck®) + 12 g NaCl (Meyer®) + 2.45 g MgSO₄ (Sigma®) + 1.6 g CaCl₂·2H₂O (Meyer®) en 1000 mL de H₂O destilada), 100 mL de solución al 8 % de Na₂CO₃ (Merck®), 100 mL de solución reductora (12.5 g L-cisteína (Sigma®) + 12.5 g Na₂S·9H₂O (Meyer®) + 2 mL de una solución 2N de NaOH (Meyer®) en 100 mL de H₂O destilada la cual se calentó a 250 °C y posteriormente se enfrió) y se agregó 0.1 mL de resazurina a 0.1 % (Sigma-Aldrich®). Los biodigestores se sometieron a flujo constante de CO₂ para mantener las condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, se cerraron

herméticamente (engargoladora manual, Wheaton, USA) mediante un tapón siliconado y una cápsula de aluminio con centro desprendible. Los frascos se incubaron en baño maría a 39 °C.

5.16 Producción de gas total y estimación de gas metano

La producción de gas total *in vitro* se midió mediante el desplazamiento de volumen de agua realizando una punción a través del tapón de silicón usando una aguja hipodérmica acoplada a una columna de vidrio graduada con agua. Las mediciones se realizaron a las 0, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 16, 20, 24, 28, 32, 44, 56, 68, 80 y 92 horas de incubación (5 repeticiones independientes por sustrato). Los mL de gas producidos se usaron para obtener los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas (V_m , mL g⁻¹), y tasa de producción de gas (S , h⁻¹).

La producción y cinética de CH₄ se realizó siguiendo la metodología propuesta por Torres et al. (2018). El biodigestor fue acoplado a un vial trampa cerrado herméticamente y lleno de una solución de NaOH (2N) por medio de una manguera Taygon® (2.38 mm Ø interno y 45 cm de longitud) con agujas hipodérmicas (20 G x 32 mm) en los extremos. La producción de CH₄ se midió a las 0, 8, 16, 24, 48, 56 y 72 h (5 repeticiones por sustrato) de cada uno de los sustratos (control, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm) y se tomó como los mL desplazados de la solución NaOH (2N), ya que el CO₂ reacciona con el NaOH formando Na₂CO₃ (Prada-Matiz & Cortés-Castillo, 2011).

5.17 Digestibilidad *in vitro* de materia seca

. Los residuos de cada fermentación se recolectaron mediante filtración a través de un embudo Buchner (papel de filtro F, rápido MOD.617, P.V.NO.1034). La digestibilidad DIVMS se estimó mediante el secado del material residual a 60°C durante 72 h y se calculó como la diferencia entre el peso de la materia seca inicial y el peso de la materia seca residual.

La descripción matemática de estos perfiles permite comparar características de los sustratos o del ambiente de fermentación. El ajuste de los datos experimentales al modelo Logístico mediante el software Sigma Plot 12© permitió obtener la Ecuación 1; donde y ($\text{ml g}^{-1} \text{MS}$) denota la cantidad de gas acumulado producido por gramo de materia seca (MS) al tiempo t (h) durante la incubación. A ($\text{ml g}^{-1}\text{MS}$) representa la máxima producción de gas a tiempo infinito. t_0 (h) es el tiempo de incubación en el que se ha producido la mitad de A y b es una constante adimensional que determina el perfil característico y por lo tanto el punto de inflexión de la curva (Groot et al.,2016).

$$y = \frac{A}{1 + \left(\frac{t_0}{t}\right)^b} \quad (1)$$

El punto de inflexión indicador de la fase de retardo (L) o Ecuación 2 resultante de dy/dt es:

$$L = t_0 \left[\frac{b-1}{b+1} \right]^{\frac{1}{b}} \quad (2)$$

Considerando la desaparición de sustrato (P) como una cinética de primer orden, la tasa de digestión del sustrato (S) (Ecuación 3) para valores de $b > 1$ aumenta hasta alcanzar un máximo (S_{max}) cuando el tamaño de la población microbiana ya no limita la fermentación del alimento. El tiempo en el que se alcanza S_{max} está dado por la resolución de $dS/dt=0$ (Ecuación 4)

$$S = \frac{1}{P} \frac{dP}{dt} = \frac{bt^{b-1}}{t_0^b + t^b} \quad (3)$$

$$t_{Smax} = t_0(b - 1)^{1/b} \quad (4)$$

5.18 Determinación de ácidos grasos volátiles por cromatografía de gases

Para la determinación de AGV se siguió la metodología propuesta por Singh et al. (2020) con algunas modificaciones. Después de la fermentación (96 h), se tomó 2 mL de sobrenadante del contenido de cada biodigestor que contenía los distintos sustratos (control, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm). Se centrifugó a 12,000 g durante 20 min. Luego se tomó 1 mL del sobrenadante y se añadió en un tubo el cual contenía 0.5 mL de ácido metafosfórico al 25%. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar por 60 min antes de centrifugar a 5000 g y se almacenó a -20 °C en viales de 2 mL para la posterior determinación de VFA. Las muestras se analizaron mediante un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer XL (Waltham, MA, EE.UU.) equipado con un FID. Se utilizó nitrógeno como gas acarreador con una pureza de 99.99% y una columna 30 m x 0.25 mm. La temperatura inicial del horno fue de 70°C por 3 min, luego incrementada 15°C/min hasta 200 °C. La temperatura final fue mantenida por 3 min. La temperatura del inyector fue programada a 250 °C. Para la determinación de los AGV, se determinaron los tiempos de retención de ácido acético, propiónico y butírico. El cálculo de la concentración fue realizado a través de curvas estándar de calibración.

5.19 Determinación de compuestos bioactivos después de la digestión *in vitro*

5.19.1 Fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó utilizando el método de Folin-Ciocalteu de acuerdo con *Pham et al.* (2017) con algunas modificaciones. Después de la fermentación (96 h), se tomó 5 mL de sobrenadante del contenido de cada biodigestor de los distintos tratamientos de pasto para forraje (control, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm). Se centrifugó a 12,000 g durante 20 min. Luego se tomó 0.5 mL del sobrenadante y se añadió en un tubo 2.5 mL de Folin-Ciocalteu al 10% (v/v), posteriormente se incubaron en oscuridad por 8 minutos y se agregó 2.0 mL de Na₂CO₃ 7.5% (p/v). Después, la mezcla se agitó con un vortex (Vortex WM-10), se dejó reaccionar por 60 min en oscuridad a 22 °C. Para finalizar se midió la absorbancia a 765 nm con espectrofotómetro (Jenway 6715, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido) utilizando como blanco el sobrenadante de un biodigestor el cual no contuvo sustrato. Se realizó una curva estándar con ácido gálico (0-100 mg L⁻¹) y el contenido de fenoles totales se expresó como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra seca (mg GAE / 100g).

5.19.2 Flavonoides totales

La determinación de flavonoides se realizó de acuerdo con Kuppusamy et al. (2018) con algunas modificaciones. Posterior a la fermentación (96 h), se tomó 5 mL de sobrenadante del contenido de cada biodigestor de los distintos tratamientos de pasto para forraje (control, 1.5, 3.0 y 4.5 ppm). Se centrifugó a 12,000 g durante 20 min. Posteriormente, se tomó 0.5 mL el cual se mezcló con 0.5 mL de una solución de tricloruro de aluminio (AlCl₃) al 10% (p/v) y 0.5 mL de nitrato de sodio al 0.1 mM. Después, la mezcla se agitó en un vortex y se incubó por 60 min a 22°C, para detener la reacción se agregó 250 µL de NaOH (1M). Después de la incubación se midió la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda a 415 nm usando un

espectrofotómetro UV-VIS (Jenway 6715, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido). Se realizó una curva de calibración estándar usando quercetina (0-100 mg L⁻¹) y utilizando como blanco el sobrenadante de un biodigestor el cual no contuvo sustrato, los resultados se expresaron en mg equivalentes de quercetina por 100 g muestra seca (mg QE/ 100g)

5.19.3 Taninos totales

El contenido de taninos se realizó de acuerdo con Price & Buttlar (1980) con algunas modificaciones. Se elaboró una solución de FeCl₃ 0.1 M utilizando HCl 0.1 M como disolvente. Posteriormente 600µL de FeCl₃ se agregó en un tubo de ensayo con 200µL del sobrenadante centrifugado a 12,000 g obtenido del contenido de cada biodigestor de los distintos tratamientos de pasto para forraje (control, 1.5, 3.0 y 4.5 mg/m²), se dejó reposar por 5 min en oscuridad. Después se adicionó 600µL K₃Fe (CN)₆ 8 mM y la mezcla se dejó reaccionar por 10 min a 22°C. La lectura de las muestras se realizó con un espectrofotómetro UV-VIS (Jenway 6715, Staffordshire, ST15 OSA, Reino Unido) a una longitud de onda de 720 nm. Se preparó un tratamiento con las mismas condiciones sustituyendo el sobrenadante de cada uno de los biodigestores con cada uno del sustrato del pasto, por el sobrenadante previamente centrifugado de un biodigestor que no contuvo sustrato, el cual se adicionó para realizar una mezcla con una solución etanol/agua (1:1), el cual se analizó y el resultado se restó a las lecturas de los distintos tratamientos. Se elaboró una curva estándar de catequina, y los resultados se expresaron como mg equivalentes de catequina por 100g de muestra seca (mgEC/100g).

5.20 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los resultados se analizaron con un análisis de varianza y cuando se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, la comparación de medias se realizó mediante el método de Tukey utilizando el software SigmaPlot 12.0 ®

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Producción de biomasa y características fenológicas de *F. arundinacea* Schreb. Plantas

La longitud de las raíces, la longitud de las hojas y la producción de biomasa aumentó ($p < 0.05$) en respuesta a la aplicación de nanopartículas de Se (Tabla 2 y Fig. 6). El pasto control (0 ppm NPs de Se) presentó menor ($p < 0.05$) producción de biomasa, tamaño de raíz y longitud (196.33 ± 6.65 , 6.92 ± 0.44 y 14.56 ± 1.45) (Fig. 6), comportamiento similar en los tres periodos de análisis. Lo anterior se atribuye a que el Se estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas debido a que incentiva la síntesis de pigmentos fotosintéticos y la organogénesis (Feng et al., 2015; Hartikainen, 2005). Algunos estudios mencionan que las NPs menores a 100 nm y concentraciones menores a 5 ppm aplicadas foliarmente penetran al tejido de la planta a través de los estomas que presentan tamaños entre los 10 y 60 μm permitiendo la absorción, translocación y el desplazamiento de las NPsSe a través del floema y llegan a los diferentes tejidos causando su efecto en distintos aspectos fisiológicos (Adhikari et al., 2016; Fricker & Wilmer, 2012). Ragavan et al. (2017) observaron que la aplicación foliar de diferentes cantidades de NPsSe afectó la longitud del brote, el tamaño de raíz y el peso fresco de la planta de frijol. Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado por Ikram et al (2020), quienes mencionan que la aplicación foliar de NPs de Se logra incrementar la altura de la planta, el peso fresco de los brotes y el tamaño de la raíz cuando se aplicaron 10 mg NPs de Se en plantas de trigo, atribuyéndolo al estímulo en la organogénesis y en el crecimiento de las raíces.

Tabla 2. Características morfológicas del pasto (*Festuca arundinacea*)

Contenido de Selenio (mg)	Primera cosecha	Segunda cosecha	Tercera cosecha
	<i>Biomasa (g)</i>		
0	$196.33 \pm 6.65^{\text{aA}}$	$221.17 \pm 9.65^{\text{aB}}$	$198.11 \pm 6.11^{\text{aA}}$
1.5	$213.66 \pm 5.03^{\text{bA}}$	$249.57 \pm 10.81^{\text{bB}}$	$215.17 \pm 7.89^{\text{bA}}$
3.0	$238.00 \pm 6.00^{\text{cA}}$	$299.23 \pm 9.22^{\text{cB}}$	$249.93 \pm 5.49^{\text{cA}}$
4.5	$275.66 \pm 7.02^{\text{dA}}$	$312.98 \pm 11.02^{\text{dB}}$	$291.18 \pm 3.02^{\text{dC}}$

	<i>Raíz (cm)</i>		
0	6.92±0.44 ^{aA}	6.76±0.87 ^{aA}	5.98±1.91 ^{aA}
1.5	7.40±0.33 ^{bA}	9.11±0.49 ^{bB}	7.49±0.68 ^{bA}
3.0	11.68±0.42 ^{cA}	13.68±0.95 ^{cB}	12.79±0.71 ^{cA}
4.5	15.94±0.51 ^{dA}	16.79±1.11 ^{dA}	15.59±0.93 ^{dA}
	<i>Longitud foliar (cm)</i>		
0	14.56±1.45 ^{aA}	14.11±4.39 ^{aA}	16.32±2.51 ^{aA}
1.5	19.81±1.68 ^{bA}	22.34±3.57 ^{bA}	24.34±1.92 ^{bA}
3.0	24.54±1.62 ^{cA}	27.84±4.97 ^{cA}	26.18±1.08 ^{cA}
4.5	32.34±2.20 ^{dA}	31.79±2.71 ^{dA}	29.34±1.11 ^{cA}

Diferentes letras minúsculas ^{a,b,c} representan diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$). Diferentes letras mayúsculas ^{A, B y C} en la misma fila representan diferencias significativas entre cada cosecha ($P < 0.05$)



Fig. 6. Efectos de diferentes concentraciones de nanopartículas de selenio (NPs Se) aplicadas por vía foliar sobre las características de gramíneas forrajeras (*Festuca arundinacea* Schreb.): (A) Control 0; (B) 1,5 ppm; (C) 3,0 ppm; (D) 4,5 ppm

6.2 Parámetros nutricionales de *F. arundinacea* Schreb.

La aplicación de NPs Se afectó ($p < 0.05$) la concentración de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE), fibra cruda (CF), fibra detergente neutra (NDF), fibra detergente ácida (ADF) y Extracto Libre de Nitrogeno (NFE) (Tabla 3). El tratamiento biofortificado con 4.5 ppm de NPs de Se incrementó el contenido de PC (14.20%, 13.44% y 13.82 %) en las distintas cosechas debido a que el Se promueve la síntesis de aminoácidos azufrados (Cys y Met) y selenoaminoácidos como SeCys y

Semet, que se incorporan a las proteínas. No obstante, también hay evidencia de que se sintetizan otros aminoácidos no proteicos, como γ -glutamil metil seleniocisteína (γ -gluMetSeCys), metil-SeCys y metil-Semet (García et al., 2020). Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Hajiboland et al. (2015) donde la aplicación de Se como fertilizante incrementó la proteína en la raíz y hoja de alfalfa (*Medicago sativa L.*). De igual forma Schiavon et al. (2016) encontró que la aspersion foliar de selenato incrementó los aminoácidos fenólicos, el contenido de proteína y nitrógeno total de la raíz en rabano (*Raphanus sativus*). Lara et al. (2019) obtuvo resultados donde la suplementación foliar de selenato de sodio en plantas de trigo (*Triticum aestivum L. variety BRS 264*) incrementó la concentración de nitrógeno total (hasta 20%) en comparación con el control. Por otra parte, esta misma tendencia se manifestó en el incremento de EE (4.3%, 4.4% y 3.9%) en los tratamientos con mayor concentración de Se (4.5 ppm Se) en cada una de las cosechas. Garcia et al. (2020) menciona que la fertilización con Se promueve el aumento de ácidos grasos (oleico, linoleico y linolénico) incrementando la concentración de lípidos; sin embargo, la vía metabólica no está clara. Lidon et al. (2018) encontró que la aplicación foliar de selenito de sodio y selenato en 4 genotipos de arroz (Ariete, Albatros, OP1105 and OP1109) aumentó el contenido de lípidos totales, y la concentración de ácido oleico (C18: 1), linoleico (C18: 2) y ácido palmítico (C16: 0).

La concentración de fibra cruda tendió a disminuir conforme la dosis de NPs de Se aumentó, lo mismo sucedió en la concentración de fibra detergente neutra (NDF) y fibra detergente acida (ADF) en las tres cosechas (NDF: 51.5%, 48.96% y 44.27%; ADF: 25.05%, 22.38% y 21.96%). Por otra parte, el contenido de NFE aumentó a mayor concentración de NPs de Se. Estos cambios pueden atribuirse a que en presencia de Se las plantas han demostrado capacidad de aumentar la concentración de azúcares solubles y en consecuencia disminuir carbohidratos estructurales debido a que el Se regula al alza el metabolismo de los carbohidratos a través del potencial redox alterado que puede estimular la nodulación (Owusu-Sekyere et al. 2013) y a su vez generar mayor fijación de CO₂ como resultado de mejor conductancia estomática. Kaur et al., (2018) menciona que el Se potencializa

la síntesis de compuestos como en el contenido de almidón, azúcares solubles totales y azúcares reductores ocasionado por el posible aumento de la actividad de las enzimas del metabolismo de los carbohidratos. Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Hajiboland et al. (2015) donde se utilizó Se para inducir cambios en el metabolismo de carbohidratos en raíz y hoja de alfalfa (*Medicago sativa L.*). Lara et al. (2019) encontraron que el contenido de carbohidratos en plantas de trigo aumentaba al biofortificar con Se, mostrando esta tendencia en cada una de las distintas cosechas.

Tabla 3. Caracterización nutricional del pasto (*Festuca arundinacea*) biofortificado foliarmente con distintas concentraciones de NPs de Se.

Se (ppm)	PC %	EE %	CF %	NDF%	ADF%	NFE%
Primera cosecha						
Control	126.1±0.95 ^{CD}	35±0.17 ^{aD}	324.2±0.26 ^{CEf}	177.8±0.14 ^{CG}	88.8±0.28 ^{CG}	327.4±0.20 ^{CE}
1.5	128.1±0.63 ^{CD}	36±0.20 ^{aC}	318.5±0.53 ^{bd}	176.5±0.05 ^{CGF}	84.5±0.09 ^{bf}	328.8±0.10 ^{bd}
3.0	134.0±0.16 ^{bc}	39±0.20 ^{bb}	312.2±0.48 ^{bc}	166.6±0.16 ^{be}	81.9±0.08 ^{be}	344.3±0.05 ^{ab}
4.5	142.0±0.36 ^{aA}	43±0.30 ^{aA}	290.7±0.25 ^{aA}	149.7±0.31 ^{aC}	72.8±0.37 ^{aC}	353.5±0.53 ^{aA}
Segunda cosecha						
Control	114.9±0.20 ^{cF}	31±0.12 ^{aG}	348.1±0.06 ^{bl}	185.7±0.60 ^{cH}	86.8±0.60 ^{cFG}	296.6±0.22 ^{cJ}
1.5	122.0±0.41 ^{be}	33±0.04 ^{aE}	342.7±0.53 ^{bH}	174.6±0.21 ^{bf}	81.1±0.12 ^{ce}	300.6±0.08 ^{bl}
3.0	126.8±0.22 ^{bd}	38±0.28 ^{bb}	331.6±0.18 ^{bG}	168.7±0.40 ^{be}	74.6±0.07 ^{bd}	306.7±0.14 ^{ah}
4.5	134.4±0.16 ^{aC}	44±0.47 ^{aA}	322.8±0.25 ^{aE}	158.1±0.38 ^{ad}	71.9±0.01 ^{aC}	311.9±0.08 ^{ag}
Tercera cosecha						
Control	116.0±0.52 ^{cF}	31±0.17 ^{aG}	327.2±0.10 ^{bf}	158.8±0.13 ^{cd}	77.5±0.01 ^{dd}	311.8±0.81 ^{bg}
1.5	120.8±0.23 ^{be}	32±0.05 ^{aF}	313.0±0.28 ^{bc}	149.9±0.26 ^{cc}	71.7±0.03 ^{cBC}	323.2±0.13 ^{bf}
3.0	121.7±0.20 ^{be}	35±0.70 ^{bCD}	316.4±0.19 ^{bd}	147.7±0.05 ^{bb}	70.1±0.11 ^{bb}	334.0±0.32 ^{aC}
4.5	138.2±0.10 ^{aB}	39±0.13 ^{cb}	301.2±0.26 ^{aB}	133.3±0.85 ^{aA}	66.1±0.23 ^{aA}	331.9±0.27 ^{aCD}

6.3 Compuestos Bioactivos

6.3.1 Contenido Total de fenoles, flavonoides, taninos

Los extractos de los tratamientos en las distintas cosechas fueron diferentes ($p < 0.05$) en el contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos totales y selenio (Tabla 4) (Sugerencia: pasa la tabla a la página siguiente después de citarla).. El extracto biofortificado con 4.5 ppm de NPs de Se contenía mayor concentración de fenoles totales presentando esta tendencia en cada uno de los distintos extractos

PC: proteína cruda, EE: Extracto etéreo, CF: Fibra cruda, NDF: Fibra detergente neutra, ADF: Fibra detergente ácida, NFE: Extracto Libre de nitrógeno Las diferentes letras minúsculas ^{a,b,c} representan diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$). Las diferentes letras mayúsculas ^{A,B y C} en la misma fila representan diferencias significativas entre cosechas ($P < 0.05$)

enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL), razón por la cual varias investigaciones han encontrado una correlación positiva con el incremento de compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes no enzimáticos (Schiavon et al. 2013). En este contexto, D'Amato et al. (2017) observaron mayor concentración de compuestos fenólicos debido a los efectos inductores observados de la actividad

PAL como resultado de la biofortificación de Se en aceite de oliva. De igual manera, Schiavon et al. (2013) suministraron selenato en tomate (*Solanum lycopersicon*) a través de las raíces, el Se estimuló la síntesis de compuestos fenólicos en las hojas. Los resultados obtenidos son similares a lo descrito por Tocai et al. (2018) donde las semillas de berro (*Lepidium sativum*) biofortificadas con 50 mg de NPs de Se, incrementaron el contenido de fenoles totales (4.896 ± 1.980 mg GAE/100 mg). Por otra parte, Hussein et al. (2019) realizaron un estudio en el que aplicaron diferentes concentraciones de NPs de Se en 3 cultivos de Maní (*Arachis hypogaea* L.) (NC, Gregory y Giza 6) los resultados mostraron que el contenido total de fenoles incrementó (1.4 mg) en los tratamientos NC y Giza 6 en comparación con el tratamiento de control (1.0 mg).

La biofortificación foliar de NPs de Se incrementó ($p < 0.05$) el contenido de flavonoides totales, siendo más evidente con 4.5 ppm de NPs de Se en las distintas cosechas (63.56, 64.96 y 61.16 mg QE/ 100g). Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular presentes en las plantas que ayudan a estabilizar radicales libres que les generan estrés (Chu et al. 2010).. De acuerdo con Schiavon et al. (2013) el incremento en los niveles de naringenina, chalcona y kaempferol entre otros flavonoides presentes en el Tomate (*Solanum lycopersicon* L.) se debe a una respuesta positiva de la aplicación de Se. Los resultados de esta investigación son similares a los reportados por Li et al. (2020), quienes demostraron que la fortificación con NPs de Se (Define como vas a escribir tu acrónimo en toda tu tesis) (5 mg / L) en apio (*Apium graveolens* L.) aumentaron 1.5 veces el total de flavonoides. Por otra parte, Golubkina et al. (2017) reportaron 2 veces más contenido de flavonoides en *Brassica juncea* L. (69.7 mg/100 g) debido a la biofortificación foliar de Se en comparación del tratamiento control (31.2 mg/100g). (Ya lo mencionaste y no es necesario “diferencias significativas” porque muestras la probabilidad de error y con eso es suficiente). Los extractos del Festuca asperjado foliarmente con NPs de Se presentaron mayor contenido de taninos siendo más evidente con 4.5 ppm NPs de Se en cada una de las cosechas. Los resultados son similares a lo reportado por Ožbolt et al. (2008) quienes irrigaron selenato de sodio (5, 10 y 20 mg/L) y selenito de sodio (10 y 20 mg/L) en semilla de Trigo Sarraceno

(*Fagopyrum esculentu*) y como resultado incrementó el contenido de taninos en hojas y tallos. (Te contradices)

6.4 Contenido de Selenio

La aplicación de 4.5 ppm de NPs de Se fue la concentración que mayor contenido de Se se traslocó en las tres cosechas del forraje. Está demostrado que las NPs de Se presentan una mayor capacidad de enriquecimiento que otras formas de suplementación de Se (Golubkina et al. 2017). El incremento de este micronutriente en los forrajes es importante ya que los rumiantes requieren de 0.1 a 0.3 mg kg⁻¹ MS de Se y este requerimiento depende del peso vivo, el tipo de dieta y la etapa fisiológica del animal, ya que el Se forma parte de la seleniocisteína, que es un aminoácido de proteínas de óxido reductoras. La deficiencia de Se altera el metabolismo de la hormona tiroidea y la respuesta inmune, además de ocasionar patologías musculares y desordenes reproductivos (Almaraz et al., 2018). La absorción y acumulación de Se en *Festuca* muestra una relación dosis-respuesta a la biofortificación foliar de NPs de Se, esta tendencia es similar a lo reportado por Golubkina et al. (2017) en espinacas (*Spinacia oleracea* L.), donde el contenido de Se incrementó debido al enriquecimiento foliar de Se. Li-Cheng et al. (2002) enriquecieron foliarmente Arroz con selenito de sodio y selenato de sodio y reportan incrementos con el selenito (0.471±0.134 µg g⁻¹) y selenato (0,640 µg g⁻¹) en comparación del tratamiento control (0.071 ± 0.002 µg g⁻¹).

Tabla 4. Contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos totales y >Se en pasto (*Festuca arundinacea*) biofortificado foliarmente con NPs de Se durante las distintas cosechas.

Se (ppm)	I	II	III
	Fenoles totales mg/100g MS		
Control	186.71±7.51 ^{aA}	207.97±5.26 ^{aB}	198.16±9.98 ^{aB}
1.5	193.60±5.06 ^{aA}	230.21±3.72 ^{bB}	228.08±2.98 ^{bB}
3.0	227.98±8.63 ^{bA}	254.51±7.22 ^{cB}	248.19±4.74 ^{bB}
4.5	249.56±7.89 ^{cA}	280.02±4.33 ^{dB}	274.63±7.34 ^{cB}
	Flavonoides totales mg/100g MS		
0	52.24±1.82 ^{aA}	52.18±2.70 ^{aA}	51.24±1.82 ^{aA}
1.5	58.88±1.23 ^{bA}	56.71±1.23 ^{bA}	54.14±1.23 ^{bA}
3.0	57.65±1.63 ^{bA}	59.09±1.63 ^{bA}	55.45±1.63 ^{bA}
4.5	63.56±1.28 ^{cA}	64.96±2.24 ^{cA}	61.16±1.28 ^{cA}
	Taninos Totales mg/100g MS		
0	101.16±2.38 ^{aA}	109.16±3.38 ^{aB}	119.11±1.11 ^{aC}

1.5	119.68±4.12 ^{ba}	145.68±9.33 ^{bb}	137.54±3.12 ^{bb}
3.0	146.47±3.18 ^{ca}	162.47±6.94 ^{cb}	166.28±1.48 ^{cb}
4.5	151.39±4.68 ^{da}	172.41±5.11 ^{db}	175.77±2.36 ^{db}
	Se ppm/kg MS		
0	0.07±0.01 ^{aA}	0.0727± 0.0058 ^{aA}	0.0693±0.0076 ^{aA}
1.5	0.12±0.01 ^{bA}	0.1122±0.0091 ^{bA}	0.1145±0.0890 ^{bA}
3.0	0.26±0.01 ^{cA}	0.2448±0.0118 ^{cA}	0.2612±0.0096 ^{cA}
4.5	0.32±0.01 ^{dA}	0.3191± 0.0148 ^{dA}	0.3218±0.0151 ^{dA}

Efecto de la aplicación foliar de 1.5, 3.0 y 4.5 mg de NPsSe en los extractos de pasto *Festuca arundinacea* en el contenido de fenoles, flavonoides y taninos. Las diferentes letras minúsculas ^{a,b,c} en las columnas representan diferencia significativa entre los tratamientos. Las diferentes letras mayúsculas ^{A,B y C} en la misma fila representan diferencias significativas del tratamiento en las diferentes cosechas del pasto ($p < 0.05$)

6.5 Actividad antioxidante en la inhibición de los radicales DPPH y ABTS

Los extractos de los pastos enriquecidos con NPs de Se presentaron aumento en la actividad antioxidante en la prueba de inhibición de radical ABTS y fue mayor ($p < 0.05$) con 4.5 ppm NPs de Se (284.26 ± 1.8 , 278.35 ± 2.2 y 289.96 ± 2.6 mg/AEE). La actividad antioxidante con la inhibición del radical DPPH es similar a la inhibición del radical ABTS (Tabla 5). El incremento de la actividad antioxidante en los extractos de Festuca biofortificado con NPs de Se se atribuye al incremento en la síntesis de fenoles totales y flavonoides, pertenecientes a sistemas antioxidantes no enzimáticos. Los flavonoides son metabolitos secundarios que tienen funciones reguladoras en el desarrollo de las plantas, protección UV y mecanismos de defensa, los cuales actúan como antioxidantes en las plantas (Hernández et al., 2019). Los compuestos fenólicos se conocen como antioxidantes de alto nivel debido a su capacidad para eliminar los radicales libres y las especies de oxígeno activo, como el oxígeno singlete, los radicales libres superóxidos y los radicales hidroxilos (Formagio et al., 2014). La actividad de captación de radicales se atribuye a la sustitución de grupos hidroxilo en los sistemas de anillos aromáticos de los compuestos fenólicos como resultado de su capacidad para donar hidrógeno (Naczek & Shahidi, 2004)., Xiao et al. (2017) demostró que las NPs de Se tienen la capacidad de eliminar los radicales ABTS mientras que Rana et al (2010) demostraron que el extracto de alfalfa (*Medicago sativa*), planta utilizada como forraje para el ganado, contiene compuestos polifenólicos que presentan actividad antioxidante, demostrado con las pruebas de captación de radicales libres ABTS y DPPH. Por otra parte, AL-Rowaily et al (2019) encontraron que los extractos de 5 geófitos (*C. capitatus* y *C. conglomeratus*, *E. farctus*, *L. scindicus* y *P. turgidum*) mostraron aumentos en la actividad inhibidora de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Debido a su alto contenido de varios metabolitos secundarios (fenólicos totales, taninos, flavonoides totales, alcaloides y saponinas). Singh et al (2019) encontraron que en cultivares de avena (*Avena sativa*), OS-6 cv. inhibió los radicales 2, 2-difenil-1' picrilhidrazilo (DPPH) y 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS).

Tabla 5. Actividad antioxidante de los extractos de pastos biofortificados con NPs de Se

Se (ppm)	I	II	III
	ABTS		
0	252.86±2.74 ^{dA}	255.67±3.75 ^{CA}	261.56±2.23 ^{dB}
1.5	274.51±2.27 ^{CA}	276.06±4.26 ^{CA}	293.97±2.88 ^{CB}
3.0	293.01±2.17 ^{bA}	295.39±3.41 ^{bA}	338.68±2.60 ^{bB}
4.5	312.78±3.47 ^{aA}	325.94±2.58 ^{aB}	351.66±3.36 ^{aC}
	DPPH		
0	217.53±2.04 ^{dA}	215.24±1.80 ^{dA}	212.77±3.20 ^{dA}
1.5	225.04±1.56 ^{CA}	227.85±2.20 ^{CA}	231.14±2.65 ^{CA}
3.0	257.24±2.31 ^{bA}	254.63±2.10 ^{bA}	269.41±3.65 ^{bB}
4.5	284.26±1.81 ^{aA}	278.35±2.20 ^{aB}	289.96±2.66 ^{aA}

Las diferentes letras mayúsculas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre cada tratamiento. DPPH se expresan en mg AAE/100 g y ABTS se expresan en mg AAE/100 g

6.6 Producción *in vitro* de gas total y metano

La producción de gas acumulado originado por la fermentación de los sustratos en las diferentes cosechas muestra un comportamiento sigmoidal durante las 92 h de fermentación. El tratamiento control (0 ppm Se) generó el mayor volumen de gas que fue similar en cada cosecha. El Festuca enriquecido con 4.5 ppm de NPs de Se presentó la menor ($p < 0.05$) producción de gas acumulado en cada cosecha (148,37, 135,22 y 141,93 mL gMS⁻¹) (Fig. 7). Lo anterior se puede atribuir al incremento de compuestos fenólicos totales y flavonoides liberados durante su fermentación en respuesta a la fertilización foliar de NPs de Se durante su crecimiento. La incorporación de compuestos fenólicos como los taninos en una fermentación ruminal afecta la microbiota, ya que pueden unirse a la pared celular de los microorganismos y causar cambios morfológicos o secreción de enzimas extracelulares que modifican su metabolismo (Smith et al., 2005). Almaraz et al (2018) reportaron que el suministro de Se (20, 40, 60 y 80 mg Se kg⁻¹MS) en la fermentación *in vitro* de heno de avena, disminuyó la producción de gas total conforme incrementó el selenito de sodio. Cajarville et al. (2015) cuantificaron la producción total de gas *in vitro* a 72 h de fermentación de *Festuca arundinacea* y reportaron 143 mL g MS⁻¹, superior al pasto fertilizado con 4,5 NPs de Se a 72 h de fermentación.

Los perfiles de producción de CH₄ indican que el volumen tiende a disminuir en respuesta a la incorporación foliar de Se de NPs (Fig. 8) siendo 57.88, 56.54 y 57.54 mL g MS⁻¹ para cada cosecha. La irrigación con 4.5 ppm de NPs de Se resultó en menor ($p < 0.05$) volumen de CH₄ en las tres cosechas (53.42, 52.65 y 53.73 mL gMS⁻¹), (Fig. 8). Singh et al (2022) realizó un estudio *in vitro* donde demostró que incorporar polifenoles genera una disminución de CH₄. Almaraz et al (2018) reportaron que al aumentar selenio en la fermentación *in vitro* del heno de avena disminuye la producción de metano y Lee et al (2021) encontraron que el suministro de hojas de olivo ricas en polifenoles como aditivo dietético reduce la emisión de

metano durante la fermentación *in vitro* debido a que disminuye la proporción de arqueas metanogénicas.

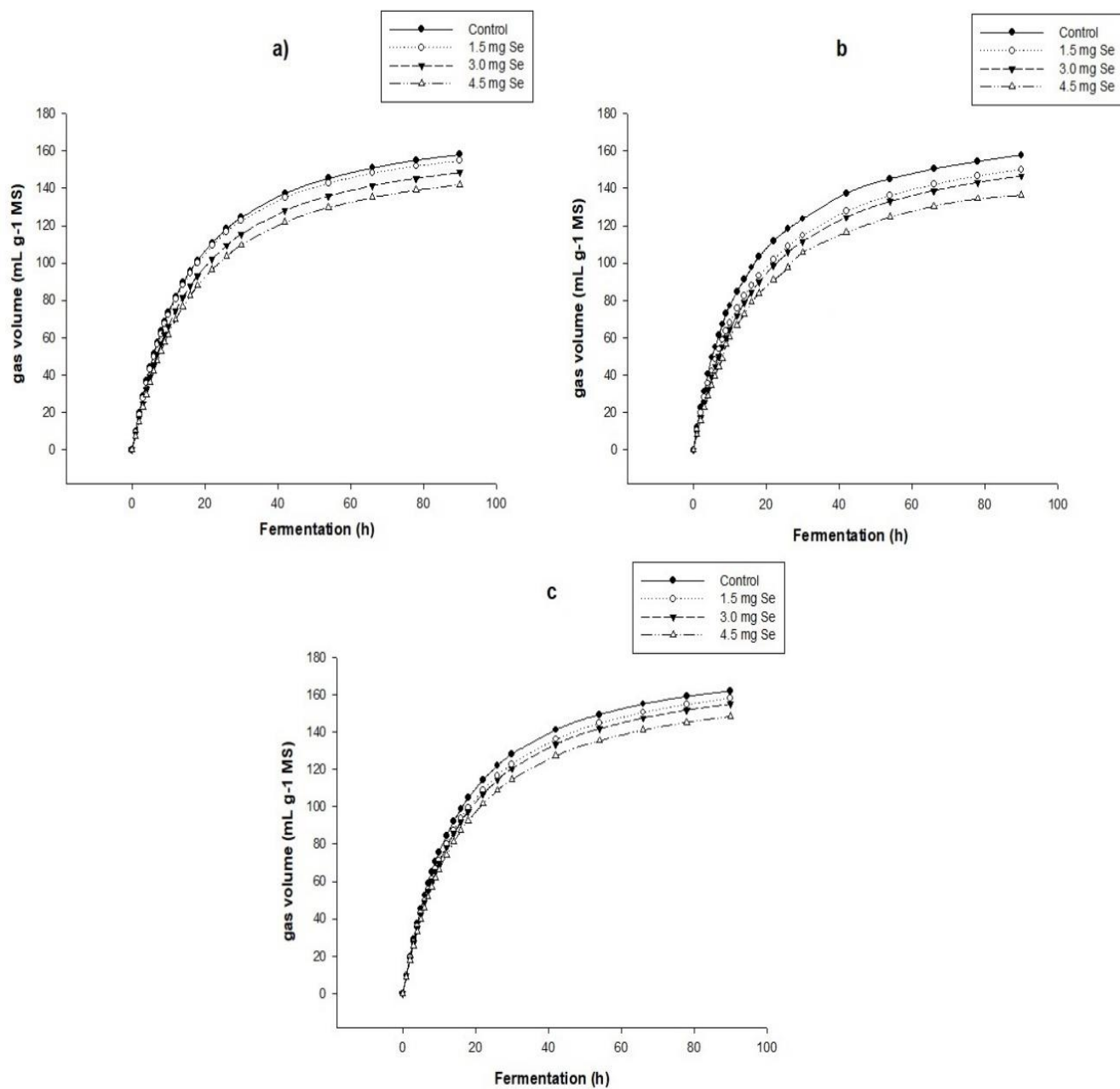


Fig. 7. Perfiles de gas total acumulado de Festuca enriquecido..... (a) Primera cosecha, (b) Segunda cosecha y (c) Tercera cosecha.

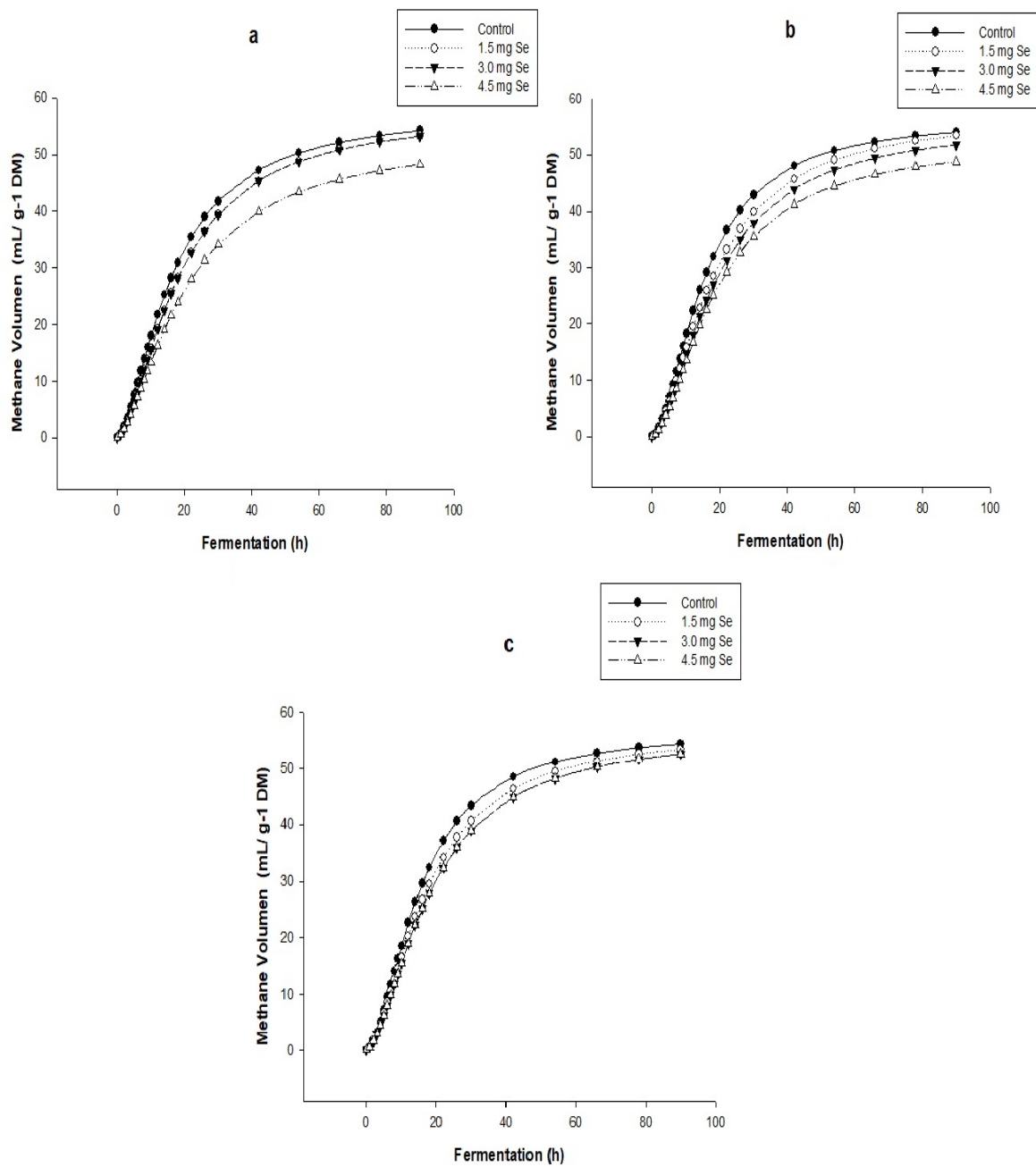


Fig. 8. Perfiles de CH₄ acumulado de Festuca enriquecido con NPs de Se.. (a) Primera cosecha, (b) Segunda cosecha y (c) Tercera cosecha.

6.7 pH y DIVMS

El pH del líquido ruminal varió de 6.52 a 6.66 pero no fue diferente ($p>0.05$) entre tratamientos (Tabla 6). El pH en la fermentación es una variable muy importante debido a que a pH por debajo de 6.5 disminuye el desarrollo de bacterias celulolíticas y genera mayores tiempos en la fase de retardo (L) que decrementan la DIVMS (Camacho et al., 2020; Mourino et al., 2001). En este estudio, el Festuca enriquecido con 4.5 ppm de NPs de Se presentó mayor ($p>0.05$) DIVMS (60.45, 59.24 y 59.42 %) en las tres cosechas a 92 h de fermentación.. Hay evidencia que el suministro de Se mejora la fermentación ruminal, digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, proteína cruda y extracto etéreo (Xun et al., 2012). Ventura et al (2019) encontraron para el pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus Schumach.*) una degradabilidad promedio de 48.9% (± 4.8), mientras que en este estudio la DIVMS del pasto (*Festuca arundinacea*) fue de 55.02 a 60.46 %, la cual incrementó conforme mayor fue el enriquecimiento con NPs de Se. Por otra parte, el tiempo de latencia (L) fue menor ($p < 0,05$) en el Festuca enriquecido con 4.5 ppmEl parámetro S_{max} mostró diferencias significativas (Tabla 6).

Tabla 6. Digestibilidad in vitro de la materia seca y parámetros de cinética de producción de gas de Festuca enriquecido.... después de 92 h de fermentación

Selenio (ppm)	Primera cosecha	Segunda cosecha	Tercera cosecha
	DIVMS (%)		
0	52.31 ± 1.35 ^{CA}	50.54 ± 1.45 ^{CA}	51.11 ± 1.15 ^{CA}
1.5	55.83 ± 1.25 ^{BA}	55.42 ± 1.38 ^{BA}	55.02 ± 1.18 ^{BA}
3.0	55.57 ± 1.12 ^{BA}	55.77 ± 1.99 ^{BA}	56.24 ± 1.11 ^{BA}
4.5	60.46 ± 2.08 ^{AA}	59.24 ± 1.75 ^{AA}	59.42 ± 1.25 ^{AA}
	pH		
0	6.55 ± 0.55 ^{AA}	6.52 ± 0.54 ^{AA}	6.52 ± 0.78 ^{AA}
1.5	6.52 ± 0.45 ^{AA}	6.57 ± 0.63 ^{AA}	6.66 ± 0.65 ^{AA}
3.0	6.51 ± 0.44 ^{AA}	6.65 ± 0.43 ^{AA}	6.51 ± 0.54 ^{AA}
4.5	6.54 ± 0.24 ^{AA}	6.63 ± 0.45 ^{AA}	6.64 ± 0.65 ^{AA}
	b (-)		
0	1.09 ± 0.005 ^{BA}	1.1089 ± 0.004 ^{CA}	1.1073 ± 0.002 ^{CA}
1.5	1.04 ± 0.009 ^{AA}	1.0834 ± 0.001 ^{BA}	1.0973 ± 0.001 ^{BA}
3	1.0557 ± 0.009 ^{AA}	1.0793 ± 0.001 ^{BA}	1.1071 ± 0.002 ^{CB}
4.5	1.0562 ± 0.008 ^{AA}	1.0503 ± 0.003 ^{AA}	1.0716 ± 0.002 ^{AB}
	to (h)		
0	14.9089 ± 0.15 ^{BC}	16.4926 ± 0.15 ^{BB}	15.9474 ± 0.11 ^{CB}
1.5	14.9428 ± 0.16 ^{BB}	16.3713 ± 0.19 ^{BA}	14.9305 ± 0.18 ^{BB}
3	14.3876 ± 0.13 ^{AB}	16.5697 ± 0.22 ^{BA}	13.6736 ± 0.11 ^{AC}
4.5	14.4339 ± 0.09 ^{AB}	15.4877 ± 0.11 ^{AA}	14.1273 ± 0.09 ^{AB}
	S (h ⁻¹)		
0	0.0505 ± 0.001 ^{BA}	0.0444 ± 0.001 ^{CB}	0.0461 ± 0.002 ^{DB}
1.5	0.0559 ± 0.001 ^{AA}	0.0468 ± 0.001 ^{BC}	0.0500 ± 0.001 ^{CB}
3	0.0566 ± 0.001 ^{AA}	0.0465 ± 0.002 ^{BC}	0.0537 ± 0.001 ^{BB}
4.5	0.0564 ± 0.002 ^{AA}	0.0533 ± 0.002 ^{AB}	0.0555 ± 0.002 ^{AA}
	t _{Smax} (h)		
0	1.5547 ± 0.01 ^{BC}	2.2329 ± 0.09 ^{CA}	2.1243 ± 0.11 ^{CB}
1.5	1.1708 ± 0.09 ^{AB}	1.7821 ± 0.10 ^{BA}	1.7861 ± 0.12 ^{BA}
3	1.2230 ± 0.09 ^{AC}	1.5829 ± 0.11 ^{BB}	1.8177 ± 0.09 ^{BA}
4.5	1.2094 ± 0.07 ^{AA}	1.1954 ± 0.12 ^{AB}	1.2063 ± 0.09 ^{AA}
	L (h)		
0	0.8551 ± 0.009 ^{CC}	1.1393 ± 0.01 ^{CA}	1.0836 ± 0.09 ^{CB}
1.5	0.6950 ± 0.007 ^{BC}	0.8395 ± 0.05 ^{BB}	0.9094 ± 0.08 ^{BA}
3	0.4715 ± 0.007 ^{AC}	0.8033 ± 0.009 ^{AB}	0.9271 ± 0.09 ^{BA}
4.5	0.4777 ± 0.008 ^{AB}	0.4537 ± 0.01 ^{AB}	0.6113 ± 0.09 ^{AA}

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las letras mayúsculas ABC indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en las muestras (columnas). Letras minúsculas a, b, c indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las mismas muestras en las tres cosechas

6.8 Cuantificación de ácidos grasos (AGV)

La producción de ácido acético y propiónico en el tratamiento enriquecido foliarmente con 4.5 ppm NPs de Se, al final de la fermentación mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos en cada una de las cosechas (Tabla 3). De igual forma, produjo la mayor concentración de AGV Totales (31.01, 31.26 y 31.24 mM L⁻¹) una disminución en la producción de acetato y un incremento en el propionato existiendo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y en cada una de las cosechas. Por otra parte, el tratamiento control, produjo el mayor contenido de ácido acético y la menor concentración de AGV Totales (Tabla 7). La disminución de ácido acético y el incremento de ácido propiónico se atribuye al enriquecimiento foliar de NPs de Se en los tratamientos, debido a que el selenio cambia el patrón de fermentación del rumen modificando la producción de acetato a propionato, donde genera el aumento de la concentración de ácido propiónico, direccionando la fermentación ruminal hacia una disminución de H⁺ disponible y así disminuyendo la producción de CH₄ (Shi et al., 2011) Una mayor producción de AGV totales está relacionada con una mayor fermentación, lo cual tiene un efecto positivo sobre una mayor disponibilidad de energía para el rumiante (Ventura et al., 2019). Estudios similares demuestran el efecto del Se en la modificación de AGV. Tal es el caso como de Cui et al. (2021) donde evaluaron el efecto de la suplementación de levadura enriquecida de Se con una dieta básica de forraje. Los resultados demuestran que la adición del Se si bien no disminuyó la producción de ácido acético, incrementó la concentración de ácido propiónico y la concentración de AGV totales. Por otra parte, Zhang et al (2020) suministraron selenito de sodio en vacas lecheras disminuyendo la proporción de acetato a propionato.

Tabla 7. Concentración final de AGV producidos durante la fermentación ruminal del forraje (*Festuca arundinacea*).

Selenio (ppm)	Primera cosecha	Segunda cosecha	Tercera cosecha
Ácido acético (mmol L ⁻¹)			
0	21.85 ± 0.35 ^{bA}	21.97 ± 0.31 ^{bA}	21.95 ± 0.15 ^{bA}
1.5	21.71 ± 0.15 ^{bA}	21.93 ± 0.28 ^{bA}	21.96 ± 0.18 ^{bA}
3.0	21.49 ± 0.12 ^{bA}	21.54 ± 0.09 ^{bA}	21.67 ± 0.11 ^{bA}
4.5	20.69 ± 0.08 ^{aA}	20.68 ± 0.11 ^{aA}	20.85 ± 0.15 ^{aA}
Acido propiónico (mmol L ⁻¹)			
0	5.45 ± 0.25 ^{cA}	5.49 ± 0.24 ^{cA}	5.42 ± 0.28 ^{cA}
1.5	6.02 ± 0.35 ^{cA}	5.77 ± 0.23 ^{cA}	5.86 ± 0.25 ^{cA}
3.0	7.11 ± 0.24 ^{bA}	7.15 ± 0.13 ^{bA}	7.51 ± 0.14 ^{bB}
4.5	8.34 ± 0.14 ^{aA}	8.63 ± 0.25 ^{aA}	8.44 ± 0.15 ^{aA}
Acido butírico (mmol L ⁻¹)			
0	1.54 ± 0.23 ^{cA}	1.55 ± 0.12 ^{cA}	1.51 ± 0.11 ^{cA}
1.5	1.58 ± 0.19 ^{cA}	1.56 ± 0.15 ^{cA}	1.58 ± 0.03 ^{cA}
3.0	1.66 ± 0.11 ^{bA}	1.72 ± 0.13 ^{bA}	1.69 ± 0.11 ^{bA}
4.5	1.98 ± 0.12 ^{aA}	1.95 ± 0.09 ^{aA}	1.95 ± 0.09 ^{aA}
Total de AGV (mmol L ⁻¹)			
0	28.84 ± 0.52 ^{cA}	29.01 ± 0.21 ^{cA}	28.88 ± 0.55 ^{cA}
1.5	29.31 ± 0.25 ^{cA}	29.26 ± 0.15 ^{cA}	29.40 ± 0.54 ^{cA}
3.0	30.26 ± 0.18 ^{bA}	30.41 ± 0.25 ^{bA}	30.56 ± 0.21 ^{bA}
4.5	31.01 ± 0.29 ^{aA}	31.26 ± 0.15 ^{aA}	31.24 ± 0.22 ^{aA}

Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. Las letras mayúsculas ABC indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en las distintas muestras (columnas). Las letras minúsculas a, b y c indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las mismas muestras en diferentes cosechas.

6.9 Determinación de compuestos bioactivos en líquido ruminal después de la digestión

Se determinó la concentración de fenoles totales, flavonoides, taninos y selenio en el líquido ruminal posterior a la digestión de los tratamientos de pasto para forraje enriquecido con NPs de Se (Tabla 8). Los resultados muestran una tendencia a incrementar en respuesta a la incorporación foliar de NPs de Se en el pasto. El tratamiento de pasto para forraje al que se le aplicó foliarmente 4.5 ppm mostró la mayor concentración de compuestos bioactivos (fenoles totales, flavonoides y taninos) y selenio, existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a los demás tratamientos y en cada una de las cosechas. El incremento de la concentración de fenoles totales, flavonoides, taninos y selenio en el líquido ruminal después de la digestión *in vitro* se puede atribuir a la liberación paulatina de estos

compuestos bioactivos presentes en mayor concentración en los pastos para forraje enriquecidos foliarmente con NPs de Se, ya que de acuerdo a García et al. (2020) el selenio modifica la vía fenilpropanoide en el metabolismo de las plantas potencializando la actividad enzimática de la fenilalanina amonio liasa (PAL), razón por la cual diferentes investigaciones han encontrado una correlación positiva con el incremento de compuestos fenólicos en plantas por el suministro de Se. De igual forma Sharma et al (2014) relaciona la respuesta que existe en el incremento de fenoles y taninos en arroz por la presencia de Se. Por otra parte, Li et al. (2020) demostraron que la fortificación con NPs de Se (5 mg / L) en apio (*Apium graveolens* L.) el total de flavonoides incrementó hasta 1.5 veces más que el del grupo de control. Respecto a la cantidad de Selenio, se encontró mayor cantidad de este elemento en el líquido ruminal al aplicar una concentración de 4.5 ppm de NPs de Se/ m², producido por la acumulación de Selenio en el pasto.

Tabla 8. La concentración final de fenoles totales, flavonoides totales, taninos totales y Se después de la fermentación ruminal de *Festuca arundinacea* con NP de Se.

Contenido de Se (ppm)	Líquido ruminal antes de la digestión	Digestión Primera cosecha	Digestión Segunda cosecha	Digestión Tercera cosecha
Fenoles totales (mg/100 mL)				
0	4.95 ± 7.51 ^{aB}	80.73 ± 1.26 ^{dA}	81.91 ± 2.35 ^{aA}	82.55 ± 2.91 ^{aA}
1.5	4.93 ± 5.06 ^{aB}	86.21 ± 2.52 ^{cA}	85.41 ± 1.99 ^{bA}	86.09 ± 1.75 ^{bA}
3.0	4.98 ± 8.63 ^{aC}	94.58 ± 1.72 ^{bA}	91.99 ± 1.44 ^{cB}	92.28 ± 2.12 ^{cB}
4.5	4.96 ± 7.89 ^{aB}	98.77 ± 1.43 ^{aA}	99.31 ± 2.91 ^{dA}	99.08 ± 1.66 ^{dA}
Flavonoides totales (mg/100 mL)				
0	1.37 ± 0.082 ^{aB}	25.18 ± 0.70 ^{dA}	23.99 ± 0.55 ^{dA}	25.18 ± 0.47 ^{dA}
1.5	1.41 ± 0.023 ^{aB}	26.71 ± 0.23 ^{cA}	25.19 ± 0.36 ^{cB}	26.71 ± 0.94 ^{cA}
3.0	1.38 ± 0.063 ^{aB}	29.09 ± 0.63 ^{bA}	28.18 ± 0.95 ^{bA}	29.02 ± 0.86 ^{bA}
4.5	1.39 ± 0.028 ^{aB}	34.96 ± 0.74 ^{aA}	35.44 ± 0.81 ^{aA}	34.96 ± 0.48 ^{aA}
Taninos totales (mg/ 100 mL)				
0	1.96 ± 0.038 ^{aB}	19.16 ± 1.55 ^{cA}	17.16 ± 1.45 ^{dA}	18.16 ± 1.38 ^{cA}
1.5	1.98 ± 0.012 ^{aB}	21.68 ± 1.23 ^{cA}	21.44 ± 1.13 ^{cA}	21.09 ± 1.37 ^{cA}
3.0	1.97 ± 0.018 ^{aB}	25.97 ± 0.94 ^{bA}	25.24 ± 1.14 ^{bA}	25.15 ± 0.64 ^{bA}
4.5	1.96 ± 0.068 ^{aB}	27.22 ± 1.05 ^{aA}	27.35 ± 0.51 ^{aA}	27.99 ± 0.45 ^{aA}
Selenio (ppm)				
0	0.0008 ± 0.0005 ^{aA}	0.0018 ± 0.0003 ^{aA}	0.0013 ± 0.0004 ^{aA}	0.0017 ± 0.0002 ^{aA}
1.5	0.0005 ± 0.0002 ^{bA}	0.0285 ± 0.0022 ^{bA}	0.0254 ± 0.0014 ^{bA}	0.0294 ± 0.0010 ^{bA}
3.0	0.0004 ± 0.0005 ^{cA}	0.0644 ± 0.0011 ^{cA}	0.0611 ± 0.0016 ^{cA}	0.0673 ± 0.0016 ^{cA}
4.5	0.0006 ± 0.0002 ^{dA}	0.0811 ± 0.0012 ^{dA}	0.0814 ± 0.0018 ^{dA}	0.0812 ± 0.0011 ^{dA}

Los resultados se expresan como la media ± desviación estándar. Las letras mayúsculas ABC indican diferencias significativas (p < 0,05) en las distintas muestras (columnas). Las letras minúsculas a,b,c indican diferencias significativas (p<0,05) entre las mismas muestras en diferentes cosechas.

CONCLUSIÓN

La biofortificación con NPs de Se mostró efectos beneficiosos sobre las características morfológicas y fisicoquímicas del pasto forrajero (*Festuca arundinacea*).

Las NPs de Se mejoran el desarrollo y síntesis de raíz, crecimiento y rendimiento del pasto.

La aplicación de NPs de Se aumentan el contenido de proteína cruda y extracto etéreo. Adicionalmente el contenido de fenoles, flavonoides, taninos y selenio, estas variables incrementan significativamente.

La actividad antioxidante del pasto es mayor debido a los efectos fisiológicos por la fertilización foliar con NP de Se.

El tratamiento con 4.5 ppm de NPs de Se presentó una mejor digestión y redujo la fase de retardo, lo cual mejora la digestibilidad del pasto forrajero (*Festuca arundinacea*) como sustrato.

Los tratamientos enriquecidos con NPs de Se muestran una tendencia a liberar un mayor contenido de compuestos bioactivos (fenoles, flavonoides y taninos) y selenio después de la digestión *in vitro*.

El tratamiento al cual se le aplicó 4.5 ppm de NPs de Se, produjo un mayor contenido de AGV totales, un menor volumen de gas total y disminuyó el contenido de gas metano.

La aplicación de NPs de Se es una buena alternativa para incorporarse en cultivos forrajeros que ayuden a mejorar los parámetros de digestibilidad y la disminución de gases de efecto invernadero.

BIBLIOGRAFÍA

Adhikari, T., Kundu, S., & Rao, A. S. (2016). Zinc delivery to plants through seed coating with nano-zinc oxide particles. *Journal of Plant Nutrition*, 39(1), 136-146.

Adhikari, T., Kundu, S., & Rao, A. S. (2016). Zinc delivery to plants through seed coating with nano-zinc oxide particles. *Journal of Plant Nutrition*, 39(1), 136-146.

Albores-Moreno, S., Alayón-Gamboa, J. A., Miranda-Romero, L. A., Alarcón-Zúñiga, B., Jiménez-Ferrer, G., Ku-Vera, J. C., & Piñeiro-Vázquez, A. T. (2019). Effect of tree foliage supplementation of tropical grass diet on in vitro digestibility and fermentation, microbial biomass synthesis and enteric methane production in ruminants. *Tropical Animal Health and Production*, 51(4), 893-904.

Alemu, A., Ominski, K. H., & Kebreab, E. (2011). Estimation of enteric methane emissions trends (1990–2008) from Manitoba beef cattle using empirical and mechanistic models. *Canadian Journal of Animal Science*, 91(2), 305-321.

Almaraz-Buendía, I., Razo-Rodríguez, O., Salinas-Martínez, J. A., Campos-Montiel, R., & Ramírez-Bribiesca, E. (2018). Concentraciones de selenio que inhiben la actividad microbiana ruminal durante la fermentación in vitro de heno de avena. *Agrociencia*, 52(4), 511-521.

Al-Rowaily, S. L., Abd-ElGawad, A. M., Alghanem, S. M., Al-Taisan, W. A. A., & El-Amier, Y. A. (2019). Nutritional value, mineral composition, secondary metabolites, and antioxidant activity of some wild geophyte sedges and grasses. *Plants*, 8(12), 569.

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemist. EUA

Araiza-Rosales, E. E., Pámanes-Carrasco, G. A., Sánchez-Arroyo, J. F., Herrera-Torres, E., Rosales-Castro, M., & Carrete-Carreón, F. O. (2022). Caracterización nutricional y producción de gas de especies vegetales con potencial alimenticio para la alimentación de rumiantes. *Revista MVZ Córdoba*, 27(2), e2142-e2142.

Aydin, S., Yıldırım, E., Ince, O., & Ince, B. (2017). Rumen anaerobic fungi create new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass. *Algal research*, 23, 150-160.

Bamberg, S. M., Ramos, S. J., Carneiro, M. A. C., & Siqueira, J. O. (2019). Effects of selenium (Se) application and arbuscular mycorrhizal (AMF) inoculation on soybean ('Glycine max') and forage grass ('Urochloa decumbens') development in oxisol. *Australian Journal of Crop Science*, 13(3), 380-385.

Bentancur Arreseigor, S., Capdevielle Trindade, L., & Ferreira Deragon, A. C. (2015). Efecto de la suplementación con selenio sobre el desempeño reproductivo de vacas de cría pastoreando campo natural de basalto.

-
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bribiesca, J. E. R., Casas, R. L., Monterrosa, R. G. C., & Pérez, A. R. (2017). Supplementing selenium and zinc nanoparticles in ruminants for improving their bioavailability meat. In *Nutrient Delivery* (pp. 713-747). Academic Press.
- Cajarville, C., Britos, A., Errandonea, N., Gutierrez, L., Cozzolino, D., & Repetto, J. L. (2015). Diurnal changes in water-soluble carbohydrate concentration in lucerne and tall fescue in autumn and the effects on in vitro fermentation. *New Zealand journal of agricultural research*, 58(3), 281-291.
- Camacho-Escobar, M. A., Galicia-Jiménez, M. M., Sánchez-Bernal, E. I., Ávila-Serrano, N. Y., & López-Garrido, S. J. (2020). Producción de metano y bióxido de carbono *in vitro* de pastos tropicales de la costa de Oaxaca, México. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 425-434.
- Carro Travieso, M. D., Evan, T. D., & Gonzalez Cano, J. (2018). Emisiones de metano en los animales rumiantes: influencia de la dieta. *Albéitar*, 220, 32-35.
- Caslavova, I., Knot, P., Horky, P., Dohnal, V., Fuksa, P., & Skladanka, J. (2019). Effect of foliar selenium application on the infestation of the perennial ryegrass *Lolium perenne* L. and tall fescue *Festuca arundinacea* Schreb. by fungal pathogen *Fusarium culmorum* (WG Sm.) Sacc. *Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS)*, 42(1), 7100-7106.
- Castillo-González, A. R., Burrola-Barraza, M. E., Domínguez-Viveros, J., & Chávez-Martínez, A. (2014). Rumen microorganisms and fermentation. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3), 349-361.
- Chen, L., Auh, C. K., Dowling, P., Bell, J., Chen, F., Hopkins, A., ... & Wang, Z. Y. (2003). Improved forage digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*) by transgenic down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. *Plant Biotechnology Journal*, 1(6), 437-449.
- Chu, J., Yao, X., & Zhang, Z. (2010). Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biological trace element research*, 136(3), 355-363.
- Cui, X., Wang, Z., Tan, Y., Chang, S., Zheng, H., Wang, H., ... & Hou, F. (2021). Selenium yeast dietary supplement affects rumen bacterial population dynamics and fermentation parameters of tibetan sheep (*Ovis aries*) in alpine meadow. *Frontiers in microbiology*, 12.
- D'Amato, R., Proietti, P., Onofri, A., Regni, L., Esposto, S., Servili, M., ... & Selvaggini, R. (2017). Biofortification (Se): Does it increase the content of phenolic compounds in virgin olive oil (VOO)?. *PLoS One*, 12(4), e0176580.

De Aluja, A. S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*, 138(3), 295-8..

de Resende Júnior, J. C., Pratti Daniel, J. L., Barreto-Vianna, A. R. D. C., Vogas Peixoto, J., Correia Guimarães, G., Fátima Costa, S. D., ... & Cruz Meirelles, F. D. (2019). Determinação do clearance de ácidos graxos voláteis na digesta ruminal intacta. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(1), 8-17.

Devesa Alcaraz, J. A., Catalán Rodríguez, P., Müller, J., Cebolla, C., & Ortúñez, E. (2013). Checklist de Festuca L.(Poaceae) en la Península Ibérica. *Lagascalia*, 33, 183-274.

Ducsay, L., & Lozek, O. (2006). Effect of selenium foliar application on its content in winter wheat grain. *Plant Soil and Environment*, 52(2), 78.

Duin, E. C., Wagner, T., Shima, S., Prakash, D., Cronin, B., Yáñez-Ruiz, D. R., & Kindermann, M. (2016). Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), 6172-6177.

El-Shazly, K. (1952). Degradation of protein in the rumen of the sheep. 2. The action of rumen micro-organisms on amino-acids. *Biochemical Journal*, 51(5), 647.

Espino-García, J. J., Campos-Montiel, R. G., González-Lemus, U., Torres-Cardona, M. G., & Sánchez-Santillán, P. (2020). In vitro fermentation of maize stover mixed with xoconostle (*Opuntia matudae* Sheinvar) and the effect on gas production. *Livestock Research for Rural Development*, 32(2).

Feng, T., Chen, S. S., Gao, D. Q., Liu, G. Q., Bai, H. X., Li, A., ... & Ren, Z. Y. (2015). Selenium improves photosynthesis and protects photosystem II in pear (*Pyrus bretschneideri*), grape (*Vitis vinifera*), and peach (*Prunus persica*). *Photosynthetica*, 53(4), 609-612.

Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. D. C., & Pereira, Z. V. (2014). Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. *Antioxidants*, 3(4), 745-757.

Fricker, M., & Willmer, C. (2012). *Stomata*. Springer Science & Business Media.

García Márquez, V., Morelos Moreno, Á., Benavides Mendoza, A., & Medrano Macías, J. (2020). Ionic selenium and nanoselenium as biofortifiers and stimulators of plant metabolism. *Agronomy*, 10(9), 1399.

Garza-García, J. J., Hernández-Díaz, J. A., Zamudio-Ojeda, A., León-Morales, J. M., Guerrero-Guzmán, A., Sánchez-Chiprés, D. R., ... & García-Morales, S. (2021). The role of selenium nanoparticles in agriculture and food technology. *Biological Trace Element Research*, 1-21.

Gaucin-Delgado, J. M., Preciado-Rangel, P., González-Salas, U., Sifuentes-Ibarra, E., Núñez-Ramírez, F., & Vidal, J. A. O. (2021). La biofortificación con selenio

mejora los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante en chile jalapeño. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(8), 1339-1349

Gerber, P. J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., ... & 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).

Germ, M., Stibilj, V., & Kreft, I. (2007). Metabolic importance of selenium for plants. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 91-97.

Gibson, D. J., & Newman, J. A. (2001). *Festuca arundinacea* Schreber (F. elatior L. ssp. *arundinacea* (Schreber) Hackel). *Journal of Ecology*, 89(2), 304-324.

Golubkina, N., Kekina, H., & Caruso, G. (2018). Yield, quality and antioxidant properties of Indian mustard (*Brassica juncea* L.) in response to foliar biofortification with selenium and iodine. *Plants*, 7(4), 80.

Groot J, Cone J, Williams BA, Debersaques F, Lantinga E. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Tech* 1996; (64): 77-89

Gutiérrez Borroto, O. (2015). La fisiología digestiva del rumiante, objeto de investigación en el Instituto de Ciencia Animal durante cincuenta años. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 49(2), 179-188.

Gutiérrez Nava, A. (2022). *Sensor de presión flexible basado en nanoalambres de plata* (Master's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

Hajiboland, R., Rahmat, S., Aliasgharzag, N., & Hartikainen, H. (2015). Selenium-induced enhancement in carbohydrate metabolism in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) as related to the glutathione redox state. *Soil science and plant nutrition*, 61(4), 676-687.

Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology*, 18(4), 309-318.

Hawthorne, J., De la Torre Roche, R., Xing, B., Newman, L. A., Ma, X., Majumdar, S. & White, J. C. (2014). Particle-size dependent accumulation and trophic transfer of cerium oxide through a terrestrial food chain. *Environmental science & technology*, 48(22), 13102-13109.

Hernández-Hernández, H., Quiterio-Gutiérrez, T., Cadenas-Pliego, G., Ortega-Ortiz, H., Hernández-Fuentes, A. D., Cabrera de la Fuente, M., ... & Juárez-Maldonado, A. (2019). Impact of selenium and copper nanoparticles on yield, antioxidant system, and fruit quality of tomato plants. *Plants*, 8(10), 355.

Hu, T., Li, H., Li, J., Zhao, G., Wu, W., Liu, L., ... & Guo, Y. (2018). Absorption and bio-transformation of selenium nanoparticles by wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in plant science*, 9, 597.

Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.

Hussein, H. A. A., Darwesh, O. M., & Mekki, B. B. (2019). Environmentally friendly nano-selenium to improve antioxidant system and growth of groundnut cultivars under sandy soil conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101080.

Ikram, M., Raja, N. I., Javed, B., Hussain, M., Hussain, M., Ehsan, M., ... & Akram, A. (2020). Foliar applications of bio-fabricated selenium nanoparticles to improve the growth of wheat plants under drought stress. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 706-714.

Kaur, M., Sharma, S., & Singh, D. (2018). Influence of selenium on carbohydrate accumulation in developing wheat grains. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 49(13), 1650-1659.

Kikkert, J., & Berkelaar, E. (2013). Plant uptake and translocation of inorganic and organic forms of selenium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 65(3), 458-465.

Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., & Chaudhry, Q. (2010). A complementary definition of nanomaterial. *Nano today*, 5(3), 165-168.

Kumar, N., Garg, A. K., Dass, R. S., Chaturvedi, V. K., Mudgal, V., & Varshney, V. P. (2009). Selenium supplementation influences growth performance, antioxidant status and immune response in lambs. *Animal feed science and technology*, 153(1-2), 77-87.

Kuppusamy, P., Lee, K. D., Song, C. E., Ilavenil, S., Srigopalram, S., Arasu, M. V., & Choi, K. C. (2018). Quantification of major phenolic and flavonoid markers in forage crop *Lolium multiflorum* using HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28, 282-288.

Lara, T. S., de Lima Lessa, J. H., de Souza, K. R. D., Corguinha, A. P. B., Martins, F. A. D., Lopes, G., & Guilherme, L. R. G. (2019). Selenium biofortification of wheat grain via foliar application and its effect on plant metabolism. *Journal of Food Composition and Analysis*, 81, 10-18..

Latina, A., & Caribe, E. (2019). *HarvestPlus Mejores Cultivos• Mejor Nutrición Biofortificación: la evidencia científica Biofortificación: la evidencia científica*. Retrieved November 2, 2022, from https://biofortificados.com/wp-content/uploads/2019/09/Biofortificacio%CC%81n-la-evidencia-cienti%CC%81fica_compressed.pdf

Lee, S. J., Kim, H. S., Eom, J. S., Choi, Y. Y., Jo, S. U., Chu, G. M., ... & Lee, S. S. (2021). Effects of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves with Antioxidant and Antimicrobial Activities on In Vitro Ruminant Fermentation and Methane Emission. *Animals*, 11(7), 2008.

Li, D., Zhou, C., Zhang, J., An, Q., Wu, Y., Li, J. Q., & Pan, C. (2020). Nanoselenium foliar applications enhance the nutrient quality of pepper by activating the capsaicinoid synthetic pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(37), 9888-9895.

Li, M. M., Sengupta, S., & Hanigan, M. D. (2019). Using artificial neural networks to predict pH, ammonia, and volatile fatty acid concentrations in the rumen. *Journal of dairy science*, *102*(10), 8850-8861.

Li-cheng, C. H. E. N., Fang-mei, Y. A. N. G., Yan-ling, Z. H. A. N. G., Qiu-hui, H. U., & Gen-xing, P. A. N. (2002). Selenium analysis of some polished rice in China and effect of biological selenium-enriched fertilizers on level and chemical constitution of selenium in rice grains. *Chinese Journal of Rice Science*, *16*(4), 341.

Lidon, F. C., Oliveira, K., Ribeiro, M. M., Pelica, J., Pataco, I., Ramalho, J. C., ... & Reboredo, F. H. (2018). Selenium biofortification of rice grains and implications on macronutrients quality. *Journal of Cereal Science*, *81*, 22-29.

Lira Saldivar, R. H., Méndez Argüello, B., Santos Villarreal, G. D. L., & Vera Reyes, I. (2018). Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Acta universitaria*, *28*(2), 9-24.

López-Vargas, E. R., Ortega-Ortíz, H., Cadenas-Pliego, G., de Alba Romenus, K., Cabrera de la Fuente, M., Benavides-Mendoza, A., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Foliar application of copper nanoparticles increases the fruit quality and the content of bioactive compounds in tomatoes. *Applied Sciences*, *8*(7), 1020.

Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Vazquez-Nuñez, E., López-Valdez, F., Prieto-Mendez, J., Madariaga-Navarrete, A., & Miranda-Arámbula, M. (2019). Remediating Polluted Soils Using Nanotechnologies: Environmental Benefits and Risks. *Polish Journal of Environmental Studies*, *28*(3).

Mekam, P. N., Martini, S., Nguetack, J., Tagliacuzzi, D., & Stefani, E. (2019). Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta* L. leaves showing antioxidant and antifungal properties. *South African Journal of Botany*, *127*, 319-332.

Menahan, L. A., & Schultz, L. H. (1964). Metabolism of leucine and valine within the rumen. *Journal of Dairy Science*, *47*(10), 1080-1085.

Mexicana, N. O. (1995). Trato Humanitario en la Movilización de Animales: NOM-051-ZOO-1995. *Diario Oficial de la Federacion*, 1998, 42-67.

Meyer, U., Heerdegen, K., Schenkel, H., Dänicke, S., & Flachowsky, G. (2014). Influence of various selenium sources on selenium concentration in the milk of dairy cows. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, *9*(2), 101-109.

Mizrahi, I., Wallace, R. J., & Morais, S. (2021). The rumen microbiome: balancing food security and environmental impacts. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(9), 553-566.

Møller, H. B., Sørensen, P., Olesen, J. E., Petersen, S. O., Nyord, T., & Sommer, S. G. (2022). Agricultural biogas production—climate and environmental impacts. *Sustainability*, 14(3), 1849.

Moreno Martín, G. (2022). Caracterización y transformación de nanopartículas metálicas y de metaloides en muestras biológicas y medioambientales.

Motesharezadeh, B., Ghorbani, S., & Alikhani, H. A. (2020). The effect of selenium biofortification in alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Plant Nutrition*, 43(2), 240-250.

Mourino, F., Akkarawongsa, R., & Weimer, P. J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of dairy science*, 84(4), 848-859

Mydin, R. B. S., Ngali, S. H., Gazzali, A. M., & Govindasamy, G. A. (2020). Intellectual Property Issues in Nanotechnology. In *Intellectual Property Issues in Nanotechnology* (pp. 3-8). CRC Press.

Naczka, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111

Nedelkov, K., Chen, X. J., Martins, C. M. M. R., Melgar, A., Harper, M. T., Räisänen, S. & Hristov, A. N. (2020). Alternative selenium supplement for sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 261, 114390.

Nenadis, N., Wang, L. F., Tsimidou, M., & Zhang, H. Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS•+ assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4669-4674.

Olesen, J. E., Schelde, K., Weiske, A., Weisbjerg, M. R., Asman, W. A. H., & Djurhuus, J. (2006). Modelling greenhouse gas emissions from European conventional and organic dairy farms. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 112(2-3), 207-220.

Oroz, M. M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química* (No. 1, pp. 33-41). Real Sociedad Española de Química.

Owusu-Sekyere, A., Kontturi, J., Hajiboland, R., Rahmat, S., Aliasghar, N., Hartikainen, H., & Seppänen, M. M. (2013). Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant and soil*, 373(1), 541-552.

Ožbolt, L., Kreft, S., Kreft, I., Germ, M., & Stibilj, V. (2008). Distribution of selenium and phenolics in buckwheat plants grown from seeds soaked in Se solution and under different levels of UV-B radiation. *Food Chemistry*, 110(3), 691-696.

Pérez Ruchel, A. (2006). pH, amoníaco, ácidos grasos volátiles y producción de proteína microbiana en el rumen de corderos, según el horario de corte de la pastura consumida.

Perozo, A. (Ed.). (2013). *Manejo de pastos y forrajes tropicales*. Ali David Perozo Bravo.

Pham, H. N. T., Tang Nguyen, V., Van Vuong, Q., Bowyer, M. C., & Scarlett, C. J. (2017). Bioactive compound yield and antioxidant capacity of *Helicteres hirsuta* Lour. stem as affected by various solvents and drying methods. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12879.

Prada-Matiz, A., & Cortés-Castillo, C. E. (2011). Experiences in the capture of combustion gases of rice husk with alkaline solutions. *ORINOQUIA*, 15(1), 16-30.

Price, M. L., Hagerman, A. E., & Butler, L. G. (1980). Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(2), 459-461.

Quintili, M. (2012). Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Cuadernos del Centro de Estudios en Diseño y Comunicación. Ensayos*, (42), 125-155.

Ragavan, P., Ananth, A., & Rajan, M. R. (2017). Impact of selenium nanoparticles on growth, biochemical characteristics and yield of cluster bean *Cyamopsis tetragonoloba*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 2(6), 238983.

Rajae Behbahani, S., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Majd, A., & Ardebili, Z. O. (2020). Red elemental selenium nanoparticles mediated substantial variations in growth, tissue differentiation, metabolism, gene transcription, epigenetic cytosine DNA methylation, and callogenesis in bittermelon (*Momordica charantia*); an in vitro experiment. *PloS one*, 15(7), e0235556.

Risk, R. (2015). Nanobioingeniería: Historia y futuro. *TecnoLógicas*, 18(34), 09-11.

Ros, G. H., Van Rotterdam, A. M. D., Bussink, D. W., & Bindraban, P. S. (2016). Selenium fertilization strategies for bio-fortification of food: an agro-ecosystem approach. *Plant and Soil*, 404(1), 99-112.

Ros, G. H., Van Rotterdam, A. M. D., Bussink, D. W., & Bindraban, P. S. (2016). Selenium fertilization strategies for bio-fortification of food: an agro-ecosystem approach. *Plant and Soil*, 404(1-2), 99-112

Ross, S. A., Srinivas, P. R., Clifford, A. J., Lee, S. C., Philbert, M. A., & Hettich, R. L. (2004). New technologies for nutrition research. *The Journal of nutrition*, 134(3), 681-685.

Sánchez-Santillán, P., Torres-Cardona, M. G., Campos-Montiel, R. G., Soriano-Robles, R., Fernández-Luqueño, F., Medina-Pérez, G. & Almaraz-Buendía, I. (2018). POTENCIAL DE EMISIÓN DE GASES EFECTO INVERNADERO DE PLANTAS FORRAJERAS POR FERMENTACIÓN ENTÉRICA. *Agroproductividad*, 11(2).

Schiavon, M., Berto, C., Malagoli, M., Trentin, A., Sambo, P., Dall'Acqua, S., & Pilon-Smits, E. A. (2016). Selenium biofortification in radish enhances nutritional quality

via accumulation of methyl-selenocysteine and promotion of transcripts and metabolites related to glucosinolates, phenolics, and amino acids. *Frontiers in plant science*, 7, 1371.

Schiavon, M., dall'Acqua, S., Mietto, A., Pilon-Smits, E. A., Sambo, P., Masi, A., & Malagoli, M. (2013). Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (*Solanum lycopersicon* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44), 10542-10554.

Scott, N. R. (2005). Nanotechnology and animal health. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 24(1), 425.

Serrano-Sevilla, I., García-Embid, S., Alleva, M., Artiga, Á., & Matteis, L. D. (2018). Nanotransportadores basados en nanocápsulas poliméricas.

Sharma, S., Goyal, R., & Sadana, U. S. (2014). Selenium accumulation and antioxidant status of rice plants grown on seleniferous soil from Northwestern India. *Rice Science*, 21(6), 327-334.

Shi, L., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., Liu, Q., ... & Shi, L. (2011). Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 163(2-4), 136-142.

SIAP. (2017). *Rumiantes: los que sí clasifican*. Gob.mx. <https://www.gob.mx/siap/articulos/rumiantes-los-que-si-clasifican>

Singh, S., Kaur, M., Sogi, D. S., & Purewal, S. S. (2019). A comparative study of phytochemicals, antioxidant potential and in-vitro DNA damage protection activity of different oat (*Avena sativa*) cultivars from India. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 347-356.

Smith, A. H., Zoetendal, E., & Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial ecology*, 50(2), 197-205.

Smith, R. (2007). The violence of the green revolution: third world agriculture, ecology and politics.

Smrkolj, P., Pograjc, L., Hlastan-Ribič, C., & Stibilj, V. (2005). Selenium content in selected Slovenian foodstuffs and estimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*, 90(4), 691-697.

Surai, P. F., & Taylor-Pickard, J. A. (Eds.). (2008). *Current advances in selenium research and applications* (Vol. 1). Wageningen Academic Pub.

Teklebrhan, T., Wang, R., Wang, M., Wen, J. N., Tan, L. W., Zhang, X. M. & Tan, Z. L. (2020). Effect of dietary corn gluten inclusion on rumen fermentation, microbiota and methane emissions in goats. *Animal Feed Science and Technology*, 259, 114314.

Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine

the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3–4): 185–197.

Tocai, M., Laslo, V., & Vicaş, S. I. (2018). Antioxidant capacity and total phenols content changes on cress (*Lepidium sativum*) sprouts after exogenous supply with nano selenium. *Natural Resources and Sustainable Development*, 8(2), 131-137.

Torres Salado, N., Sanchez Santillan, P., & Herrera Perez, J. (2018). Producción de gases efecto invernadero in vitro de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano.

Underwood, E. (2012). *Trace elements in human and animal nutrition*. Elsevier.

Van Soest, P. (1990). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. II. A Rapid Method for the Determination of Fiber and Lignin. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, Vol 73; 491-497|.

Vargas, J. A. C. (2019). Función y metabolismo de ácidos grasos en el tejido adiposo y hepático de rumiantes en producción: una revisión. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 14(2), 30-44.

Vargas, J., Cárdenas, E., Pabón, M., & Carulla, J. (2012). Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Archivos de zootecnia*, 61(237), 51-66.

Ventura Ríos, J., Reyes Vazquez, I., García Salas, A., Muñoz García, C., Muro Reyes, A., Maldonado Peralta, M. D. L. Á., ... & Cruz Hernández, A. (2019). Rendimiento, perfiles nutrimental y de fermentación ruminal in vitro de pasto maralfalfa (*Cenchrus purpureus* Schumach.) Morrone a diferentes frecuencias de corte en clima cálido. *Acta universitaria*, 29.

Wallace, R. J., Snelling, T. J., McCartney, C. A., Tapio, I., & Strozzi, F. (2017). Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genetics Selection Evolution*, 49(1), 1-11.

Wang, Z., Tan, Y., Cui, X., Chang, S., Xiao, X., Yan, T., ... & Hou, F. (2019). Effect of different levels of selenium yeast on the antioxidant status, nutrient digestibility, selenium balances and nitrogen metabolism of Tibetan sheep in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Small ruminant research*, 180, 63-69.

Xun, W., Shi, L., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., & Liu, Q. (2012). Effect of high-dose nano-selenium and selenium–yeast on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Biological trace element research*, 150(1), 130-136

Zanella, R. (2012). Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 5(1), 69-81.

Zhang, Z. D., Wang, C., Du, H. S., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J. & Zhang, S. L. (2020). Effects of sodium selenite and coated sodium selenite on lactation performance, total tract nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows. *animal*, 14(10), 2091-2099.