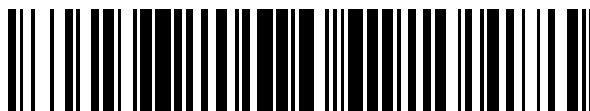


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 577 628**

51 Int. Cl.:

A23K 20/116 (2006.01)

A23K 50/10 (2006.01)

A23K 20/111 (2006.01)

A23K 20/163 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013 E 13721610 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2838376**

54 Título: **Composición de pienso para reducir la metanogénesis en rumiantes**

30 Prioridad:

19.04.2012 EP 12164765

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.07.2016

73 Titular/es:

**INTERQUIM, S.A. (100.0%)
Joan Buscallá, 10
08173 Sant Cugat del Vallès, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BALCELLS TERÉS, JOAQUIM y
CRESPO MONTERO, FRANCISCO JAVIER**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 577 628 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición de pienso para reducir la metanogénesis en rumiantes.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones novedosas para la reducción de la metanogénesis en rumiantes.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Metano, dióxido de carbono y óxido nitroso son los gases principales con efecto invernadero.

15 El metano (CH₄) es un gas de efecto invernadero cuya concentración atmosférica ha aumentado drásticamente durante el último siglo y, después del dióxido de carbono, es el mayor contribuyente potencial al calentamiento de la Tierra. El aumento del nivel de metano troposférico se correlaciona estrechamente con la expansión mundial de la población humana. En consecuencia, se cree que aproximadamente un 70% de las emisiones de metano están asociadas a actividades humanas. Los vertidos de desechos y las prácticas agrícolas generan y liberan metano a la atmósfera en cantidades que aumentarán a medida que crezca el número de personas en el mundo.

20 Los rumiantes, que incluyen bovinos, búfalos, ovejas y cabras, tienen un gran estómago anterior donde ocurre la fermentación productora de metano. El tracto digestivo de los rumiantes está formado por cuatro compartimentos gástricos, rumen, retículo, abomaso y omaso. El mayor y más importante de éstos es el rumen. El rumen funciona como compartimento de fermentación. Contiene grandes poblaciones de microorganismos incluyendo arqueas productoras de metano, que degradan el material vegetal. Se hace referencia comúnmente a dichos microorganismos como metanógenos. Las poblaciones de arqueas usan hidrógeno y dióxido de carbono, productos de la fermentación microbiana anaeróbica, para generar energía para el crecimiento, produciendo metano como producto final. Finalmente, el metano se expulsa del rumen mediante la eructación.

30 La producción de metano por bovinos y ovejas representa una ruta de pérdida de carbono que reduce la productividad. Si la energía que se pierde a través de la síntesis de metano pudiera recanalizarse a través de otras rutas bioquímicas, comúnmente a la síntesis de propionato, la fermentación del rumen se volvería más eficaz y se reflejaría en mejoras en la ganancia de peso o producción de leche del animal. Sería rentable para el productor así como proporcionaría una herramienta eficaz para reducir las emisiones de metano a la atmósfera. Es más, debido a que la duración del metano en la atmósfera es de 12 años (mientras que las de dióxido de carbono y óxido nitroso son de 100 años y 120 años, respectivamente), reducir las emisiones de metano tendría un efecto más rápido sobre el entorno.

40 Estudios pasados con animales rumiantes han mostrado que la producción de metano está afectada por la dieta. Al aumentar la relación de carbohidratos estructurales/no estructurales (celulósicos/almidónicos), aumentan las emisiones de metano. Además, la adición de fuentes lipídicas a la dieta reduce las emisiones de metano entérico. Aunque, paralelamente a la reducción de metano, las altas tasas de suplementos grasos reducen la fermentación microbiana del rumen, la ingesta de alimento y la digestibilidad de fibra. Se han introducido una serie de aditivos químicos de piensos tales como antibióticos (concretamente ionóforos) o agentes desfaunantes en la nutrición de rumiantes para promover el crecimiento, mejorar la utilización del pienso y reducir la producción de metano. Sin embargo, los problemas sobre la presencia de residuos químicos en productos animales y el desarrollo de resistencia bacteriana ante antibióticos han estimulado la búsqueda de alternativas naturales más seguras que serían útiles en la explotación de ganado orgánica.

50 Se ha mostrado que las plantas o extractos de plantas que contienen aceites esenciales, taninos, saponinas, flavonoides y muchos otros metabolitos secundarios vegetales mejoran el metabolismo del rumen al dirigirse a grupos específicos de poblaciones microbianas del rumen. Patraa A.K. y Saxenab J (2010). Phytochemistry, 71 (11-12): 1198-222 describen el uso de metabolitos secundarios vegetales para inhibir la metanogénesis en el rumen. El documento WO2005000035 hace referencia a un procedimiento para potenciar la fermentación ruminal y, en particular, reducir la metanogénesis, consistente en la administración de un extracto soluble de alfalfa obtenido a partir de alfalfa fresca.

EP2085083 A1 describe el uso de una mezcla de naringina, extracto de naranja amargo y sepiolita para mejorar la fermentación ruminal en rumiantes.

60 Existe por tanto la necesidad de composiciones de pienso de rumiantes alternativas que comprendan compuestos de origen natural y que sean tanto eficaces para reducir la producción de metano como seguros para su uso en la explotación de ganado.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han encontrado ahora que administrando una composición de pienso que comprende compuestos naturales a rumiantes, se reduce significativamente la emisión de metano.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención hace referencia a un procedimiento para reducir la producción de metano en rumiantes que comprende administrar por vía oral a dicho rumiante una composición de pienso que contiene un glucósido de flavanona seleccionado del grupo consistente en neohesperidina, isonaringina, poncirina y hesperidina o una mezcla de las mismas.

En una realización particular de la invención, dicha composición es una mezcla que comprende neohesperidina y poncirina. En una realización más particular, dicha mezcla comprende adicionalmente naringina. En una realización preferida, dicha mezcla es un extracto de planta natural. En una realización más preferida, dicha planta es un extracto de planta cítrica.

En una realización particular de la invención, dicha composición comprende adicionalmente un vehículo. En una realización preferida, dicho vehículo es sepiolita.

En una realización particular, dicha composición es una mezcla que comprende de un 25 a un 55 % en peso de naringina, de un 10 a un 20 % en peso de neohesperidina, de un 1 a un 5 % en peso de poncirina y suficiente cantidad hasta un 100 % en peso de vehículo. En una realización preferida, dicha composición comprende de un 40 a un 50 % en peso de naringina, de un 11 a un 15 % en peso de neohesperidina, de un 3 a un 5 % de poncirina y suficiente cantidad hasta un 100 % en peso de vehículo.

En una realización particular de la invención, dicho rumiante es un ternero, vaca, búfalo, oveja, ciervo o cabra. En una realización preferida, dicho rumiante es un ternero.

En una realización particular, la composición de la invención se añade al pienso en forma sólida a una concentración de 50 a 1000 mg/kg de MS. En una realización preferida, la composición se añade a una concentración de 200 a 500 mg/kg de MS.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa el perfil de producción de biogás y metano. Las dosis medias usadas en el sistema de simulación "in vitro" se obtuvieron con la ración no suplementada (control) o suplementada con diferentes tipos de flavonoides.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se explica anteriormente, los autores de la presente invención han encontrado que al administrar a un rumiante una composición de pienso que comprende flavonoides, en particular glucósidos de flavanona, se reducen significativamente las emisiones de metano.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención hace referencia a un procedimiento para reducir la producción de metano en rumiantes que comprende administrar por vía oral a dicho rumiante una composición de pienso que contiene un glucósido de flavanona seleccionado del grupo constituido por neohesperidina, isonaringina, poncirina y hesperidina o una mezcla de las mismas.

El término "rumiante" como se usa aquí hace referencia a cualquier mamífero artiodáctilo del suborden Ruminantia.

Dichos mamíferos mastican el bolo y tienen un estómago de cuatro compartimentos, uno de los cuales es el rumen.

El grupo incluye, entre otros, ciervo, antílopes, búfalo, bovinos, oveja, camello y cabra.

El término "flavonoides" como se usa aquí hace referencia a una clase de pigmentos vegetales hidrosolubles productores de pigmentación amarilla o roja/azul en pétalos. El término "flavanonas" hace referencia a un tipo de flavonoides. Las flavanonas se glucosilan generalmente por un disacárido en posición 7 para dar "glucósidos de flavanona".

Como se muestra en los ejemplos siguientes, los inventores han encontrado sorprendentemente que las emisiones de metano se reducen significativamente al administrar a rumiantes una composición de pienso según la presente invención.

La producción de metano por rumiantes puede medirse usando procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, el procedimiento trazador de hexafluoruro de azufre (SF₆) es una técnica que permite medir el metano de

vacas individuales en el campo, usando bidones a vacío alrededor del cuello de la vaca que muestrean continuamente el aliento expirado. Otros procedimientos incluyen cámaras de respiración en circuito abierto, que son salas selladas y climáticamente controladas que albergan una sola vaca cada una, permitiendo el análisis de todos los gases producidos por el animal.

El metano emitido puede medirse también mediante espectroscopía infrarroja, cromatografía de gases, espectroscopía de masas y técnicas de láser de diodos ajustables, técnicas de encerramiento (por ejemplo, calorimetría de la respiración), ecuaciones predictivas basadas en el equilibrio de fermentación de las características del pienso, técnicas de trazado isotópico, etc.

Además, la producción de metano puede medirse "in vitro". En este caso, se recoge el fluido del rumen del animal y se incuba con un medio de incubación en condiciones anaeróbicas.

En una realización particular de la invención, dicha composición es una mezcla que comprende neohesperidina y poncirina. En una realización más particular, dicha mezcla comprende neohesperidina, poncirina y naringina. En otra realización particular de la invención, dicha mezcla está en forma de un extracto de planta natural. En una realización preferida, dicho extracto de planta es un extracto de planta cítrica, y más preferiblemente un extracto de planta de naranja amarga, conteniendo dicho extracto diferentes flavonoides, en particular glucósidos de flavanonas. En una realización preferida, dicho extracto de planta contiene una mezcla de neohesperidina, poncirina y naringina. Como se muestra en los Ejemplos siguientes, dicho extracto de planta es un extracto de planta natural que comprende aproximadamente un 20% en peso de naringina y un 40% en peso de extracto de naranja amarga (de un 25 a un 27% de naringina; de un 11 a un 13% de neohesperidina y de un 3 a un 5% de poncirina). En un caso particular, dicho extracto de planta natural está comercialmente disponible (Bioflavex®).

Por lo tanto, según la presente invención, las flavanonas de la composición de la presente invención pueden obtenerse a partir de una planta, más particularmente de una planta cítrica.

Todos los componentes de la composición según la presente invención son productos de origen natural y fácilmente obtenibles. Además, cuando la composición está en forma de una mezcla, dicha mezcla es fácil de manejar y puede prepararse según procedimientos de formulación industriales conocidos por los expertos en el campo.

El término "cítrico" como se usa en la presente memoria hace referencia a una planta del género Citrus. Los ejemplos de dichas plantas cítricas incluyen Citrus maxima (pampelmusa), Citrus médica (cidra) Citrus reticulate (mandarina), Citrus aurantium (naranja amarga), Citrus latifolia (lima persa), Citrus limon (limón) Citrus paradisi (pomelo), Citrus sinensis (naranja dulce), Citrus trifoliata (naranja trifoliada), etc.

Los procedimientos para el aislamiento de flavonoides a partir de plantas son bien conocidos en el estado de la técnica. En un caso particular, el extracto de naranja amarga puede obtenerse a partir de frutas cítricas molidas (especialmente Citrus aurantium) mediante procedimientos ordinarios bien conocidos por el experto en la materia tales como extracción, filtración, concentración, precipitación, clarificación y secado final. Los procesos de extracción pueden efectuarse en sistemas binarios alcohol/agua, en los que el alcohol se selecciona de metanol, etanol, propanol y similares. Se usa preferiblemente metanol. Como ejemplo ilustrativo no limitante, se extraen 50 g de naranja amarga seca con 300 ml de metanol. Se centrifuga la suspensión para separar el residuo y las aguas madre se concentran a vacío a un volumen final de 50 ml. Se deja reposar el líquido resultante a temperatura ambiente durante 5 días, se filtra para separar el material insoluble, se concentra, se filtra de nuevo a través de un lecho de tierra de diatomeas y se seca por pulverización.

En una realización particular, dicha flavanona puede obtenerse a partir de la fruta de una planta cítrica. Por ejemplo, la naringina es una flavanonaglicosilada obtenida a partir de la piel de algunos frutos cítricos tales como pomelo (Citrus paradise) y naranja amarga (Citrus aurantium). Se encuentra también en la pulpa de la fruta y en las hojas, flores y semillas de la planta. Son procedimientos ilustrativos, no limitantes, para el aislamiento de los flavonoides según la presente invención, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos US2421063A y US2421062A, en los que se describe un procedimiento para la recuperación de naringina a partir de material vegetal. También puede obtenerse hesperidina según los procedimientos descritos en los documentos US2442110A, US2348215A y US2400693A. Igualmente, puede obtenerse neohesperidina según el procedimiento descrito en el documento US3375242A. El documento US3375242A describe un procedimiento para producir neohesperidina en el que se hace reaccionar la naringina con isovainillina, produciendo calcona de neohesperidina. Esta calcona se cicla entonces proporcionando neohesperidina.

Adicionalmente, las flavanonas de la presente invención pueden obtenerse fácilmente ya que están comercialmente disponibles. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos que acompañan la presente invención, isonaringina, neoneritrocina y poncirina se adquieren en INDOFINE Chemical Company, Inc (EE.UU.). También, como se describe anteriormente, dicho extracto de planta natural según la presente invención está comercialmente disponible (Bioflavex®).

En una realización particular de la invención, dicha composición es una mezcla que comprende de un 25 a un 55 % en peso de naringina, de un 10 a un 20 % en peso de neohesperidina, de un 1 a un 5 % en peso de poncirina y suficiente cantidad hasta 100 % en peso de vehículo. En una realización más particular, dicha composición comprende de un 40 a un 50 % en peso de naringina, de un 11 a un 15 % en peso de neohesperidina, de un 3 a un 5 % de poncirina y suficiente cantidad hasta un 100 % en peso de vehículo. Según otra realización preferida de la presente invención, la composición comprende un vehículo. En una realización particular, dicho vehículo es sepiolita. La sepiolita es un mineral de arcilla de origen sedimentario natural. Es una arcilla porosa ligera no hinchable con una gran área superficial específica. Químicamente, la sepiolita es un silicato de magnesio hidratado cuyas partículas individuales tienen morfología acicular. La alta área superficial y la porosidad de esta arcilla dan cuenta de su notable capacidad de absorción de líquidos. Estas propiedades la hacen un material valioso para un amplio intervalo de aplicaciones tales como arena para mascotas, aditivos de pienso animal, vehículos, absorbentes, aditivos de suspensión y tixotrópicos y espesantes.

Según el procedimiento de la invención, las emisiones/producción de metano se reducen en rumiantes cuando los animales se alimentan con una composición según la presente invención que comprende flavonoides de origen natural. La eficacia del pienso tiene relevancia económica en la industria ganadera. Es conocido que los compuestos que inhiben la metanogénesis en rumiantes dan como resultado un desplazamiento de la fermentación del rumen hacia la producción de un perfil de ácidos grasos más deseable, aumentando la proporción de propionato en lugar de acetato, y volviendo por tanto más eficaz la fermentación energética del rumen (véanse las patentes de EE.UU. nº 3.745.221, 3.615.649 y 3.862.333). Por lo tanto, es un objeto adicional de la presente invención proporcionar un procedimiento para la inhibición de la metanogénesis en animales rumiantes con el efecto beneficioso resultante sobre la fermentación microbiana del rumen de aumento de la eficacia de utilización del pienso. Como se muestra en los ejemplos siguientes, las composiciones según la presente invención reducen los niveles de metano producidos y desplazaban la producción de ácidos grasos volátiles a favor del ácido propiónico.

Los procedimientos para la determinación de los ácidos grasos volátiles son bien conocidos en la materia. Típicamente, se usan procedimientos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de gases con detección por ionización de llama.

El modo de alimentación no está limitado a ninguno en particular, y la composición de pienso de la presente invención puede procurarse mediante espolvoreado sobre el pienso compuesto o alimentarse después de mezclar la presente composición de pienso con el pienso compuesto. Tampoco la cantidad de alimentación está limitada, a condición de que se reduzca eficazmente la metanogénesis sin afectarse adversamente el equilibrio nutricional.

Por tanto, en una realización preferida de la invención, dicha composición se añade al pienso en forma sólida. En una realización particular, dicha composición se añade a una concentración de 50 a 1000 mg/kg de MS (materia seca). En una realización más particular, dicha composición se añade al pienso en forma sólida a una concentración de 200 a 500 mg/kg de MS.

La composición según la presente invención puede contener otros ingredientes de pienso tales como vitaminas, enzimas, sales minerales, cereales molidos, componentes que contienen proteína, componentes que contienen carbohidrato, moyuelos y/o salvados de trigo.

La forma de la composición de pienso según la presente invención no está limitada a ninguna en particular y puede estar en cualquier forma de una composición de pienso convencional, tal como un polvo y un aglomerado. También, dicha composición de pienso puede producirse según el procedimiento empleado generalmente para producir un pienso compuesto y un suplemento de pienso.

En una realización particular de la invención, dicho rumiante es un ternero, una vaca, un búfalo, una oveja, un ciervo, un camello, o una cabra. En una realización preferida, dicho rumiante es un ternero.

La presente invención se describirá ahora con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos, que no deberían considerarse en modo alguno como limitantes del alcance de la presente invención.

55 EJEMPLOS

Materiales y procedimientos

Se diseñaron dos ensayos siguiendo un protocolo experimental idéntico para estudiar el efecto de diferentes flavonoides puros sobre la fermentación de rumen usando un sistema simulado "in vitro" basado en el protocolo experimental descrito por Theodorou M K et al. (1994) *Animal Feed Science and Technology*, 48 (3), p.185-197; Mauricio, R.M., et al. (1999) *Animal Feed Science and Technology* 79, 321-330.

Se determinó la producción de gas a partir de un manómetro semiautomático, la relación entre niveles de presión y volumen de gas producido se había calculado anteriormente.

Se usaron terneros con el rumen canulado que recibían una ración mixta compuesta principalmente por concentrado (90:10) como donantes de fluido de rumen; la composición de pienso se presenta en la Tabla 1. Se recogió el inóculo, se filtró a través de una gasa quirúrgica de dos capas y se mantuvo en termos. Se dosificaron por triplicado flavonoides (Tabla 2) más 600 mg de concentrado (Tabla 1) y 60 mg de paja de cebada como sustrato en frascos precalentados (a 39 °C) y se mantuvieron en condiciones anaeróbicas. Se adquirieron los flavonoides isonaringina, neoeritrocina y poncirina en INDOFINE Chemical Company, Inc (EE.UU.). Se añadieron 10 ml de fluido de rumen y 40 ml de medio de incubación a los frascos (McDougall, El (1948) "Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva". Biochem J. 43(1) 99-109). Una vez se llenaron los frascos y se aplicó la condición anaeróbica, se sellaron los frascos y se inició el proceso de incubación en un baño de agua caliente. Se hicieron lecturas de presión a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 horas. Se incubó cada muestra por triplicado en dos conjuntos o lotes.

Tabla 1. Composición química del concentrado (%)

Ingredientes (%):	Control
Maíz	35
Cebada	25
Harina de soja (al 44 %)	10
Harina de girasol (al 30 %)	3,5
Salvado de trigo	6
Pienso con gluten (al 20 %)	8
Pulpa de remolacha azucarera	7
Aceite de palma	2,5
Calcio mineral	1,3
Fosfato bicálcico	0,8
Sal	0,3
Complemento de Vit/Min	0,4
Sepiolita	0,2
Bioflavex® (*)	0
Composición química	
Proteína bruta	16
PB (degradable)	11
FDN	22,4
Almidón	41
Cenizas	5,8
EM, (Mcal/kg de MS)	2,9

PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutra; MS: materia seca, EM: energía metabolizable

(*) 20% en peso de naringina; 40% en peso de extracto de naranja amarga; sepiolita hasta 100% en peso.

Tabla 2: Dosis de flavonoides (mg/kg de MS) usadas en el primer y segundo experimentos

Flavonoides	Dosis I	Dosis II
Exp 1		
Naringina	200	500
Neohesperidina	"	"
Hesperidina	"	"
Isonaringina	"	"
Neoeriocitrina	"	"
Poncirina	"	"
Bioflavex		

Exp 2

Excipiente (sepiolita)	“	“
CBC (*)	“	“
Neohesperidina	“	“
Bioflavex	“	“

(*) complejo de bioflavonoides cítricos

Después de 12 horas de incubación, se abrió un frasco (duplicado) de cada tratamiento, se registró el pH y se muestreó el frasco para análisis de ácidos grasos volátiles. (Jouany, J.P., 1982 Science des Aliments 2, 131-144), lactato (Taylor, K.A.C.C., 1996. Appl. Biochem. Biotechnol. Enzym. Eng. Biotechnol. 56, 49-58) y amoniaco (Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Clin. Chem. 8, 130-132).

Se extrajo el ADN ambiental usando la técnica propuesta por Yu y Morrison (2004). La cuantificación del ADN de *Streptococcusbovis*, *Megasphaeraelsdenii* y *Selenomonasruminantium* se realizó mediante PCRq usando cebadores específicos (Tajima, K. et al. 2001. Appl. Environ. Microb. 67, 2766-2774; Ouwerkerk, D., et al. 2002. J. Appl. Microbiol. 92, 753-758). Los resultados se analizaron estadísticamente usando el procedimiento PROC MIXED del paquete estadístico SAS (SAS, 2000, Manual del usuario: Statistics, version 8 editionsinst., Inc., Cary, NC). Se usó la diferencia mínima significativa para comparar las medias. Se aceptaron como significativas diferencias entre medias de $P < 0,05$.

Resultados:

1. Producción de gas:

La Figura 1 muestra la cinética de la producción de gas y metano cuando se suplementaba el cultivo “in vitro” de fluido ruminal con diferentes tipos y dosis de flavonoides. Los perfiles representan los valores medios para ambas dosis. Los valores medios para cada tratamiento, dosis y tiempo de muestreo se presentan en la Tabla 3, junto con los análisis estadísticos de los resultados.

Los niveles de producción de gas aumentaban exponencialmente con el tiempo de incubación. La adición de flavonoides alteraba significativamente la producción de biogás ($P < 0,05$) aunque este cambio no ocurría homogéneamente entre las diferentes sustancias flavonoides. La neoeriocitrina aumentaba los niveles de producción de gas en comparación con el control (266,7 frente a 253,72, $P > 0,05$), la naringina no los cambiaba ($P > 0,05$), mientras que el resto de polifenoles reducía los niveles de producción medios ($P < 0,05$). Los valores más bajos correspondían a neohesperidina y la mezcla Bioflavex® (230,7 y 233,3, respectivamente). Isonaringina, poncirina y hesperidina (236,6, 238 y 239,6, respectivamente) reducían también la producción de gas. Los niveles de inclusión (200 y 500 mg/kg) tenían un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la producción de gas, pero este efecto era diferente según el tipo de flavonoide. Se consiguió el efecto de dosificación más pronunciado con neohesperidina.

Se analizaron los efectos de las sustancias flavonoides sobre la actividad de fermentación de ciertas poblaciones de arqueas que son teóricamente responsables de la producción de metano. La Figura 1(b) muestra los valores de evolución de la producción de metano y la Tabla 4 presenta los valores medios y análisis estadísticos.

El rendimiento medio de metano era menor que el biogás total producido. Para el control, el rendimiento de metano era aproximadamente un 15% de la producción de gas total. Los tratamientos experimentales modificaban la producción de metano media y acumulada, pero estos cambios eran distintos entre los tratamientos: la neoeriocitrina aumentaba ($P < 0,05$) el nivel de producción de metano en comparación con el control. La actividad metanogénica no se modificaba por la inclusión de hesperidina o naringina en el medio de cultivo ($P < 0,01$). Sin embargo, neohesperidina, isonaringina, poncirina y la mezcla Bioflavex reducían la producción de metano ($P < 0,05$). La neohesperidina mostraba la reducción más pronunciada, que difería también de la hesperidina ($P < 0,05$). En general, la dosificación “per se” no mostraba una diferencia significativa excepto en el caso de la neohesperidina, en que la producción de metano se reducía más al aumentar la dosis.

El diseño experimental permite determinar si el efecto de los flavonoides sobre la reducción de metano derivaba de una reducción general de la actividad microbiana y la producción de biogás o por el contrario el flavonoide afecta específicamente a poblaciones metanogénicas (arqueas). Con este fin, se muestra en la Tabla 5 el análisis estadístico de la contribución del metano a la producción de gas total. La presencia de flavonoides en el medio de cultivo reducía la contribución del metano a la producción de biogás total ($P < 0,05$), aunque de nuevo el impacto anteriormente mencionado era heterogéneo.

5 La inclusión de neoeriocitrina (Tabla 5) aumentaba significativamente la proporción de metano, pero la presencia de Bioflavex y neohesperidina claramente la reducía (13,70 frente a 13,66 y 14,58 para neohesperidina, Bioflavex y el control, respectivamente). El resto de polifenoles reducía numéricamente la actividad metanogénica, aunque las diferencias reseñadas no eran estadísticamente significativas. La dosificación (500 frente a 200 mg/kg de MS) de neoeriocitrina y mezcla Bioflavex tendía a reducir la producción de metano, aunque el resto de sustancias FL no mostraba ningún efecto y se refleja por una interacción significativa de la dosis x sustancia FL ($P < 0,05$).

10 En el segundo ensayo, se ensayaron sepiolita (como carga) y CBC (complejo cítrico de bioflavonoides) frente a una referencia negativa (sin flavonoides, CONTROL) y dos positivas (con fuentes de flavonoides tales como neohesperidina y Bioflavex). El efecto del excipiente (sepiolita) era nulo en términos de producción de gas y metano (Tabla 6 y 7), mientras que el CBC reducía moderadamente la producción de gas, pero no se detectaban cambios en la producción de metano.

15 Tabla 3. Producción acumulada (72 h) y media del biogás en medios de cultivo de fluido de rumen "in vitro" suplementados con diferentes tipos de flavonoides, dosis y tiempos de incubación

Elementos	Flavonoides	EEM ¹	Tiempo de incubación				EEM	Dosis ²		EEM
			12	24	48	72		1	2	
Neoeriocitrina	266,78 ^a		211,78	259,11	288,43	307,80		277,08	256,47	
Naringina	248,17 ^{bc}		193,90	236,91	270,98	290,91		251,15	245,19	
Isonaringina	236,62 ^{de}		185,58	223,38	258,85	278,66		235,13	238,1	
Poncirina	237,95 ^{cde}	1,87	180,63	224,90	262,00	284,28	2,61	234,43	241,48	2,65
Neohesperidina	230,71 ^e		175,93	217,84	253,99	275,06		238,13	223,28	
Hesperidina	239,65 ^{cd}		187,19	227,31	261,28	282,84		239,91	239,4	
Bioflavex	233,36 ^{de}		181,44	219,64	255,47	276,89		235,73	231,00	
CONTROL	253,72 ^b	2,65	198,71	242,07	275,69	298,43	3,69			
Significación										
	Flavonoides	Hora	Dosis	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	0,0011	***	ns	ns	ns			

1 EEM: error estándar de la media

2Dosis: 0,2 g/kg de MS y 0,5 g/kg de MS del sustrato

20 *P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias ($P < 0,05$).

25 Tabla 4. Producción acumulada (72 horas) y media de metano en medios de cultivo de fluido de rumen "in vitro" suplementados con diferentes tipos de flavonoides (tratamientos), dosis y tiempos de incubación.

Elementos	Flavonoides	EEM ¹	Hora				EEM	Dosis ²		EEM
			12	24	48	72		1	2	
Neoeriocitrina	38,40 ^a		29,65	37,03	41,74	45,18		39,51	37,28	
Naringina	31,50 ^b		23,38	29,46	34,93	38,24		32,28	30,73	
Isonaringina	27,42 ^{de}		19,84	24,94	30,81	34,08		27,40	27,43	
Poncirina	27,04 ^{de}	0,52	19,19	24,43	30,50	34,07	0,66	26,61	27,47	0,74
Neohesperidina	25,54 ^e		18,02	23,15	28,84	32,18		27,63	23,46	
Hesperidina	28,42 ^{cd}		21,08	26,03	31,54	35,04		28,11	28,74	
Bioflavex	27,33 ^{de}		20,17	24,74	30,53	33,89		26,30	28,36	
CONTROL	30,70 ^{bc}	0,74	23,00	28,17	33,84	37,77	0,94			
Significación										
	Flavonoides	Hora	Dosis	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	ns	0,001	ns	ns	ns			

¹ EEM: error estándar de la media

2Dosis: 0,2 g/kg de MS y 0,5 g/kg de MS del sustrato

*P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias (P <0,05).

5 Tabla 5. Proporción de metano en el biogás producido en medios de cultivo de fluido de rumen "in vitro" suplementados con diferentes tipos de flavonoides (tratamientos), dosis y tiempos de incubación.

Elementos	Flavonoides	EEM ¹	Hora				EEM	Dosis ²		EEM
			12	24	48	72		1	2	
Neerocietrina	16,07 ^a		14,00	15,75	16,33	18,19		15,96	16,17	
Naringina	14,86 ^b		12,04	14,28	16,14	16,97		14,87	14,85	
Isonaringina	14,48 ^{bc}		10,68	13,56	16,79	16,89		14,53	14,43	
Poncirina	13,86 ^{cd}	0,15	10,62	11,94	16,54	16,34	0,30	13,92	13,80	0,22
Neohesperidina	13,66 ^d		10,21	12,34	15,91	16,20		13,98	13,35	
Hesperidina	14,16 ^{cd}		11,26	12,40	16,43	16,55		14,05	14,27	
Bioflavex	13,70 ^d		11,12	12,13	16,32	16,03		13,27	14,53	
CONTROL	14,59 ^{bc}	0,22	11,58	12,03	17,11	17,65	0,42			
Significación										
	Flavonoides	Hora	Dosis	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	0,0385	0,001	***	ns	ns			

1 EEM: error estándar de la media

2Dosis: 0,2 g/kg de MS y 0,5 g/kg de MS del sustrato

*P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias (P <0,05).

15 Tabla 6. Producción acumulada (72 h) y media de biogás en medios de cultivo de fluido de rumen "in vitro" suplementados con diferentes tipos de flavonoides (tratamientos), dosis y tiempos de incubación.

Elementos	Flavonoides	EEM ¹	Hora				EEM	Dosis ²		EEM
			12	24	48	72		1	2	
Excipiente (Sepiolita)	282,19 ^a		222,40	264,81	306,38	326,17		279,7	276,7	
CBC	278,67 ^b		224,32	267,09	303,25	320,01		276,8	280,5	2,00
Neohesperidina	268,16 ^c	1,41	215,60	256,18	292,28	308,57	1,55	267,1	269,2	
Bioflavex	262,42 ^c		209,55	250,47	286,10	303,55		259,3	265,5	
CONTROL	285,08 ^a		225,74	272,58	312,61	329,40				
Significación										
	Flavonoides	Hora	Dosis	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	ns	0,0124	***	ns	ns			

1 EEM: error estándar de la media

2Dosis: 0,2 g/kg de MS y 0,5 g/kg de MS del sustrato

*P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias (P <0,05).

Tabla 7. Producción acumulada (72 h) y media de metano en medios de cultivo de fluido de rumen "in vitro" suplementados con diferentes tipos de flavonoides (tratamientos), dosis y tiempos de incubación.

Elementos	Flavonoides	EEM ¹	Hora				EEM	Dosis ²		EEM
			12	24	48	72		1	2	
Excipiente (Sepiolita)	34,03 ^a		25,24	31,53	38,37	40,99		34,7	33,4	
CBC	34,40 ^a		26,04	32,13	38,27	41,16		34,6	34,2	
Neohesperidina	30,44 ^b	0,45	22,52	27,98	34,31	36,95	0,47	30,1	30,8	0,64
Bioflavex	30,63 ^b		22,78	28,22	34,30	37,23		29,8	31,4	
CONTROL	34,54 ^a		25,02	31,99	39,18	41,97				
Significación										
	Flavonoides	Hora	Dosis	FxD	FxH	FxDxH	DxH			
	***	***	ns	ns	***	ns	ns			

1 EEM: error estándar de la media

2Dosis: 0,2 g/kg de MS y 0,5 g/kg de MS del sustrato

*P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias (P <0,05).

2. Caracterización de la fermentación ruminal

2.1 Concentración de VFA y amoníaco

Se presentan en la Tabla 8 las concentraciones medias de ácidos grasos volátiles (VFA) y amoníaco (N-NH₃) en los medios 'in vitro', con o sin flavonoides (respecto a los tipos y dosis). Se muestran las concentraciones medias (μ) de ambos (VFA y N-NH₃) en las primeras columnas respectivas siguiendo su evolución a lo largo del tiempo de incubación para cada tipo y dosis de flavonoide. Numéricamente, Bioflavex mostraba mayores concentraciones medias y acumuladas de VFA; sin embargo, las diferencias no alcanzaban significación estadística (P > 0,05). Los niveles de amoníaco superaban los niveles umbral para asegurar una fermentación microbiana apropiada (50 mg/l). Aparentemente, neoeriocitrina (227,84 mg/l) y la mezcla Bioflavex (209,92 mg/l) mostraban los valores medios más alto y más bajo, respectivamente.

Las concentraciones iniciales de VFA (valores constantes registrados a t= 0) aumentaban. Los aumentos eran mayores entre las 0 y 12 h que los valores registrados entre las 12 y 72 h, reflejando la gradual fermentación de sustrato durante el tiempo de incubación [concretamente, el aumento de la concentración media de VFA (mmol/l) era de 2,1 mmol/hora en el primer periodo (0-12 horas), mientras que después de este periodo estos aumentos se redujeron a una media de 0,2 mmol/hora]. Según la actividad de tampón de la mezcla mineral, el aumento en la concentración de VFA no se reflejaba en un aumento de la acidez del medio. Los valores medios de pH eran de 6,81, 6,77±0,0034 y 6,73±0,0033 a las 0, 12 y 72 horas, respectivamente. La estabilidad del medio se prueba por el pequeño error estándar de la media.

2.2 Proporciones molares de VFA

La suplementación de medios con fuentes de carbohidrato (principalmente compuestas por almidón, concretamente concentrado) causaban una variación significativa en el perfil de VFA que conduce a un aumento de las proporciones de propionato (20,03, 28,20 y 26,45) y butirato (9,07, 9,88 y 10,45 a las 0, 12 y 72 horas, respectivamente), mientras que se observaba una reducción de la proporción de acetato (mol/100 mol; 62,5, 55,86 y 55,86). Sin embargo, los aumentos no eran homogéneos entre los diferentes tipos de flavonoide. La proporción de ácido propiónico en los medios mejoraba por naringina, isonaringina, poncirina, mezcla Bioflavex y neohesperidina en comparación con el control, mientras que por el resto no. Debería observarse que en neohesperidina, naringina y Bioflavex, la respuesta al tiempo de incubación se modulaba también significativamente por las dosis (D x H: P <0,009). En general, se observaba una correlación negativa entre la producción de metano (Tabla 5) y la proporción de propionato (Tabla 9), la inclusión de neoeriocitrina aumentaba la proporción de metano mientras que lo contrario era cierto en el caso de neohesperidina y Bioflavex, que reducen claramente la emisión de metano (13,70 y 13,66 frente a 14,58 para neohesperidina, Bioflavex y control, respectivamente), mejorando la proporción de propionato (25,7 y 25,8 frente a 24,4 (P<0,1) y 23,7 (P<0,05) para neohesperidina y Bioflavex, frente a las proporciones de propionato de control y neoeritrocina, respectivamente).

Tabla 8. Concentración de ácidos grasos volátiles (VFA; mmol/l) y amoníaco (N-NH₃; mg/l) en cultivos de fluido ruminal "in vitro" sin suplementación (control) o suplementados con diferentes tipos y dosis de flavonoides.

Elementos	VFA, mmol/l				N-NH ₃ , mg/l			
	μ	0	12	72	M	0	12	72
Neoeriocitrina	35,76	13,78	39,75	53,75	227,84	149,99	186,19	347,34
Naringina	33,35	13,78	35,23	51,03	219,57	149,99	172,47	336,25
Isonaringina	34,18	13,78	36,49	52,26	212,66	149,99	165,46	322,53
Poncirina	34,21	13,78	36,98	51,87	209,16	149,99	159,33	318,15
Neohesperidina	34,60	13,78	36,97	53,04	219,18	149,99	168,38	339,17
Hesperidina	35,25	13,78	38,25	53,70	220,15	149,99	187,36	323,11
Bioflavex	36,50	13,78	41,31	54,41	209,92	149,99	172,47	319,31
Control	34,09	13,78	40,19	48,29	208,18	149,99	164,00	310,56
EEM ¹	2,19				1,06			
Significación								
Elemento	Flavonoides	Hora	Dosis	F x D	F x H		D x H	
VFA total	ns	***	Ns	ns	Ns		Ns	
N-NH ₃ ,	ns	***	Ns	ns	Ns		Ns	

- 5 1 EEM: error estándar de la media
 2Dosis: 0,2 g/kg de MS y 0,5 g/kg de MS del sustrato
 *P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo
 Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias (P <0,05).

- 10 Tabla 9. Relación molar (mol/100 mol) de ácidos acético, propiónico y butírico y tasa de A/P a diferentes tiempos de incubación en cultivos de fluido ruminal "in vitro" sin suplementación (control) o suplementados con diferentes tipos y dosis de flavonoides.

Elementos	% de acetato			% de propionato			% de butirato			A/P					
	μ	0	12	72	M	0	12	72	μ	0	12	72	0	12	72
Neeriocitrina	58,15	62,51	55,73	56,21	23,73 ^a	20,03	26,77	24,39	10,90 ^b	9,07	11,84	11,79	3,12	2,09	2,31
Naringina	57,18	62,51	53,70	55,34	25,59 ^b	20,03	30,00	26,75	9,96 ^{ab}	9,07	10,47	10,33	3,12	1,79	2,07
Isonaringina	57,26	62,51	53,94	55,34	25,72 ^b	20,03	30,20	26,94	9,87 ^{ab}	9,07	10,31	10,24	3,12	1,79	2,06
Poncirina	57,77	62,51	55,44	55,36	25,51 ^b	20,03	29,52	26,96	9,63 ^a	9,07	9,61	10,20	3,12	1,88	2,05
Neohesperidina	57,62	62,51	54,68	55,68	25,66 ^b	20,03	30,05	26,91	9,57 ^a	9,07	9,68	9,96	3,12	1,82	2,07
Hesperidina	58,48	62,51	56,88	56,04	24,35 ^{ab}	20,03	27,22	25,80	10,08 ^{ab}	9,07	10,41	10,78	3,12	2,09	2,17
Bioflavex	59,12	62,51	58,22	56,64	25,78 ^b	20,03	28,33	26,97	9,21 ^{ab}	9,07	8,47	10,11	3,12	2,06	1,98
Control	58,27	62,51	58,35	53,94	24,43 ^{ab}	20,03	28,32	27,93	9,20 ^a	9,07	8,31	10,21	3,12	2,06	2,19
EEM	0,61	2,19			0,30	0,51			0,21	0,36					0,07

Significación

Elemento	Flavonoides	Hora	Dosis	F x D	F x H	D x H
Acetato	ns	***	ns	ns	ns	0,0263
Propionato	**	***	ns	ns	†	0,0089
Butirato	**	***	ns	ns	*	ns
Ace/Prop	*	***	ns	ns	ns	0,017

1 EEM: error estándar de la media

*P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

2.1. Concentración de lactato y perfil microbiano

Se ha demostrado experimentalmente la relación entre las concentraciones de lactato intraluminal y la disfunción por acidosis. Se muestran en la Tabla 10 los valores de concentración de lactato y títulos de bacterias productoras (*S. bovis*) o consumidoras (*S. ruminantium* y *M. elsdenii*) de lactato obtenidos de frascos incubados durante 12 horas.

El efecto de la suplementación con diferentes flavonoides sobre la concentración de ácido láctico era moderado y solo la presencia de neohesperidina, hesperidina y Bioflavex tendía a moderar el aumento registrado del periodo de incubación ([c] t = 0: 22,16 mg/l). Las variaciones en las condiciones de fermentación descritas anteriormente (Tabla 8 y 9) daban como resultado un aumento de las concentraciones de ADN microbiano, aunque el aumento alcanzaba significación estadística sólo en el caso de neohesperidina, cuando los títulos se comparaban frente a control, neohesperidina, poncirina y hesperidina. Los tratamientos experimentales no alteraban los títulos de *S. bovis* ni *S. ruminantium*, sin embargo, según los resultados obtenidos de los experimentos anteriores, tanto neohesperidina como la mezcla Bioflavex mejoraban el título de *M. elsdenii* registrado en comparación con los valores de control registrados.

Tabla 10: Efecto del tipo de flavonoide en la concentración de ácido láctico y la concentración de ADN bacteriano (mg/ml) determinado por PCRq y cuantificación relativa de las poblaciones ruminales de *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* y *Megaesphaera elsdenii* a las 12 horas de incubación "in vitro" de cultivo de fluido ruminal sin suplementación (control) o suplementado con diferentes tipos y dosis de flavonoides.

Elemento	Lactato (mg/l)	ADN bacteriano (µg/ml)	Cuantificación relativa 2 ^(ΔΔCt)		
			<i>S. bovis</i>	<i>S. ruminantium</i>	<i>M. elsdenii</i>
Neohesperidina	122,5	13,14 ^a	0,62	0,79	0,76 ^a
Naringina	77,8	22,15 ^{ab}	0,48	0,74	1,26 ^c
Isonaringina	92,4	16,18 ^{ab}	0,46	0,86	1,08 ^{ab}
Poncirina	87,5	10,12 ^a	0,44	0,68	0,98 ^{ab}
Neohesperidina	45,8	23,93 ^{ab}	0,25	0,53	1,35 ^c
Hesperidina	44,3	9,18 ^a	0,58	0,74	1,18 ^b
Bioflavex	36,6	21,24 ^{ab}	0,32	0,36	1,46 ^c
Control	71,71	12,28 ^a	0,74	0,51	1,08 ^{ab}
EEM	6,76	3,065	0,11	0,11	0,24
Significación	†	*	ns	ns	*

1 EEM: error estándar de la media

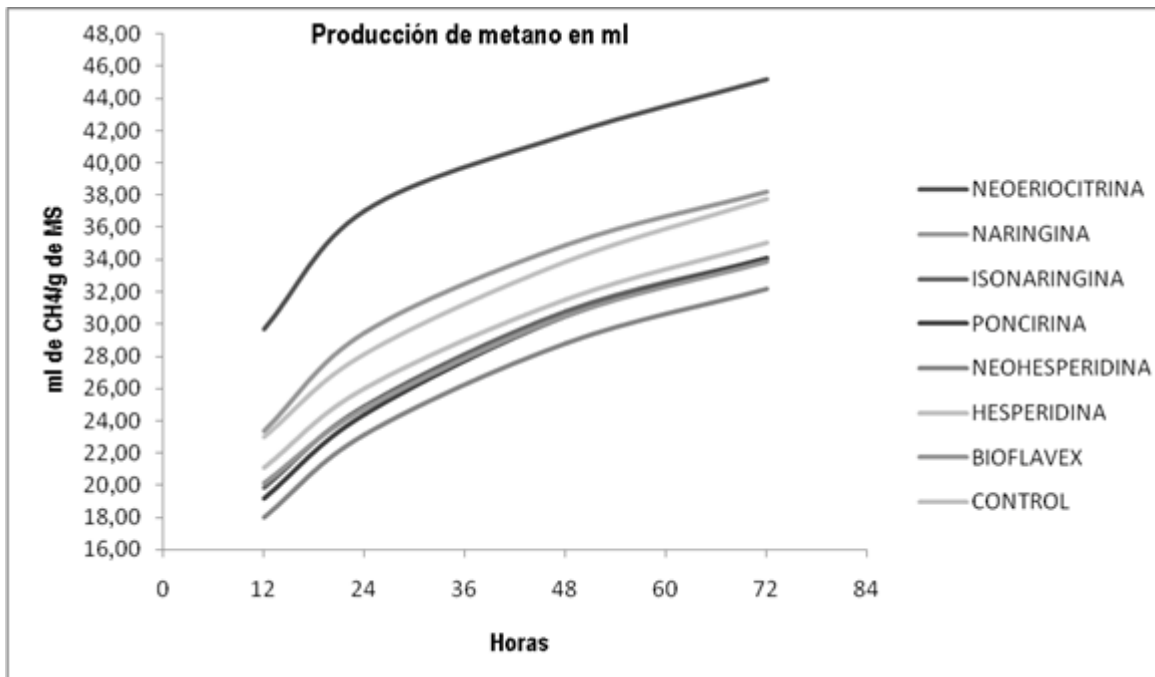
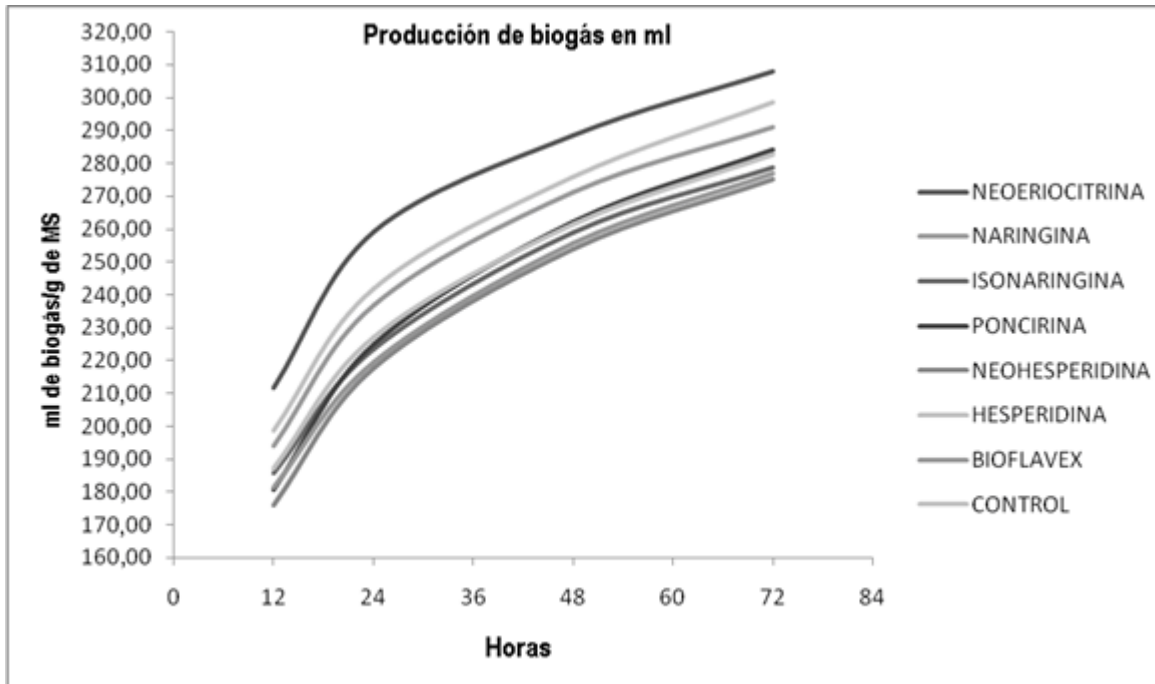
*P <0,05, **P <0,01, *** P <0,001 y ns no significativo

Las medias con diferentes índices (a, b, c, d) indican diferencias significativas entre estas medias (P <0,05).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para reducir la producción de metano en rumiantes que comprende administrar por vía oral a dicho rumiante una composición de pienso que contiene un glucósido de flavanona seleccionado del grupo constituido por neohesperidina, isonaringina, poncirina y hesperidina o una mezcla de los mismos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha composición de pienso es una mezcla que comprende neohesperidina y poncirina.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en la que dicha mezcla comprende adicionalmente naringina.
- 10 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha mezcla es un extracto de planta natural.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho extracto de planta natural es un extracto de planta cítrica.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha composición comprende adicionalmente un vehículo.
- 15 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha composición es una mezcla que comprende de 25 a 55% en peso de naringina, de un 10% a un 20% en peso de neohesperidina, de un 1% a un 5% en peso de poncirina y suficiente cantidad hasta un 100% en peso de vehículo.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicha composición comprende de un 40 a un 50% en peso de naringina, de un 11 a un 15% en peso de neohesperidina, de un 3 a un 5% de poncirina y suficiente cantidad hasta un 100% en peso de vehículo.
- 20 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho vehículo es sepiolita.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho rumiante es un ternero, una vaca, un búfalo, una oveja, un ciervo, un camello o una cabra.
11. Procedimiento según la reivindicación 10, en el que dicho rumiante es un ternero.
- 25 12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicha composición se añade al pienso en forma sólida a una concentración de 50 a 1000 mg/kg de materia seca.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que dicha composición se añade al pienso en forma sólida a una concentración de 200 a 500 mg/kg de materia seca.

FIGURA 1



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 10 • WO2005000035 A [0007] • US2400693A [0031]
 • EP2085083 A1 [0008] • US3375242A [0031]
 • US2421063A [0031] • US3.745.221 [0035]
 • US2421062A [0031] • US3.615.649 [0035]
 • US2442110A [0031] • US3.862.333 [0035]
 15 • US2348215A [0031]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- 20 • **Patraa A.K. y Saxenab J.** Phytochemistry, 2010, 71 (11-12): 1198-222 [0007] • **Taylor, K.A.C.C.**, Appl. Biochem. Biotechnol. Enzym. Eng. Biotechnol., 1996, 56, 49-58 [0045]
 • **Theodorou M K et al.** Animal Feed Science and Technology, 1994, 48 (3), p.185-197 [0043] • **Chaney, A.L., Marbach, E.P.**, 1962. Clin. Chem. 8, 130-132 [0045]
 • **Mauricio, R.M.**, et al. Animal Feed Science and Technology, 1999, 79, 321-330 [0043] • **Tajima, K. et al.**. Appl. Environ. Microb., 2001, vol. 67, 2766-2774 [0046]
 25 • **McDougall, El** "Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva". Biochem J. ,1948, 43(1) 99-109 [0044] • **Ouwerkerk, D., et al.** J. Appl. Microbiol., 2002, 92, 753-758 [0046]
 • **Jouany, J.P.**, Science des Aliments 1982, 2, 131-144 [0045] • **Manual del usuario: Statistics, inst., Inc** [0046]
 30