

## Efecto de diferentes niveles de aceite esencial de cítrico y su componente activo en la fermentación microbiana ruminal y la producción *in vitro* de metano

Sobhy M.A. Sallam<sup>1</sup> y Samir A. M. Abdelgaleil<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Alexandria University, 21545-El-Shatby, Alexandria, Egypt.

<sup>2</sup> Department of Pesticide Chemistry, Faculty of Agriculture, Alexandria University, 21545-El-Shatby, Alexandria, Egypt.

Correo electrónico: s\_sallam@yahoo.com

Se evaluaron *in vitro* las características de la fermentación al adicionar diferentes niveles (0, 25, 50 y 75  $\mu\text{L}/75\text{ mL}$  de fluido ruminal buferado) del aceite esencial de cítrico o su componente bioactivo (limoneno, 0, 30, 45 y 60  $\mu\text{L}/75\text{ mL}$  fluido ruminal buferado) a un sustrato basal (50 % alimento fibroso: 50 % concentrado) mediante la técnica de producción de gas (PG) semiautomática. El aceite esencial de cítrico investigado fue *Citrus reticulata* (CR<sub>25</sub>, CR<sub>50</sub>, CR<sub>75</sub>), y limoneno (L<sub>30</sub>, L<sub>45</sub>, L<sub>60</sub>). Los análisis de los aceites esenciales de cítricos mediante CG/EM mostraron que los componentes principales fueron dl-limoneno (83.9 %) y  $\gamma$ -terpineno (10.75 %). Hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción acumulativa de gas (PG) luego de sustraer el volumen de gas del control y agregar diferentes niveles del aceite esencial de cítrico o el limoneno. Todos los niveles del aceite esencial del cítrico y el limoneno disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) la PG con respecto al sustrato sin aditivo. La segunda y la tercera dosis de aceite esencial del cítrico o el limoneno disminuyeron ( $P < 0.05$ ) la emisión de metano cuando se expresó en base de materia seca, pero cuando se expresó sobre la base de la materia orgánica digerida solo la tercera dosis del aceite esencial de cítrico redujo ( $P < 0.05$ ) la emisión de metano *in vitro*. La inhibición de la producción de metano estuvo acompañada de una reducción significativa del conteo de protozoos. El factor que se usó como índice de la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana fue el factor de fraccionamiento (FF) *in vitro*. No hubo efecto significativo de los aceites esenciales de cítrico en el FF, mientras que la suplementación con el limoneno disminuyó ( $P < 0.05$ ) los valores del FF. La inclusión del aceite de cítrico esencial o el limoneno afectó negativamente la digestibilidad verdadera de la materia seca y la orgánica. La concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  se redujo drásticamente al incluir altos niveles del cítrico o del limoneno. Este estudio sugiere que el aceite esencial de cítrico tiene el potencial de afectar la eficiencia de la fermentación ruminal y pudiera ser un prometedor agente mitigante del metano, lo que se atribuyó a su rico contenido de limoneno.

Palabras clave: cítrico, limoneno, aceite esencial, producción de gas, metano, protozoos, degradación.

Debido a la aparición de residuos y de cepas de bacterias resistentes al uso de antibióticos como promotores del crecimiento en el alimento animal, la utilización de los antibióticos ha quedado prohibida en la Unión Europea desde enero de 2006 (Regulación 1831/2003/EC). Esto ha incentivado el interés por buscar enfoques más naturales tales como los aceites esenciales (AE) derivados de plantas, como aditivos alimentarios alternativos naturales para mejorar la fermentación ruminal, la eficiencia alimentaria y el comportamiento animal. Los aceites esenciales son mezclas complejas de metabolitos secundarios y compuestos volátiles extraídos de las plantas por métodos de destilación, en particular la destilación por vapor (Greathead 2003). Los aceites esenciales tienen actividad microbiana contra bacterias gram-negativas y gram-positivas, una propiedad que ha sido atribuida a la presencia de compuestos terpenoides y fenólicos (Conner 1993). Químicamente, los aceites esenciales son mezclas variables de, fundamentalmente, terpenoides, especialmente los monoterpenos (C10) y sesquiterpenos (C15), aunque los diterpenos (C20) también pueden estar presentes. La mayoría de los aceites esenciales se clasifican como Generalmente Reconocido como Seguro, y han sido aprobados para su consumo como alimento y bebida por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (US Food and Drug Administration). Sin embargo, pocos extractos vegetales han sido probados por sus efectos en la fermentación microbiana ruminal (Cardozo *et al.* 2004, Castillejos

*et al.* 2005, Busquet *et al.* 2006 y Calsamiglia *et al.* 2007), especialmente en la emisión de metano. Los análisis de los aceites esenciales de cítricos por GC/MS indicaron que el principal componente activo es el limoneno. Por tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de diferentes niveles de aceite esencial de cítrico y su componente activo (limoneno) en la actividad de la fermentación microbiana ruminal y en la emisión *in vitro* de metano.

### Materiales y Métodos

**Materiales vegetales.** Se recolectaron varias partes de *Citrus reticulata* Balanco (cáscara de la fruta) durante la etapa de floración en diferentes locaciones del estado de Alejandría y la Península del Sinaí, Egipto, en agosto de 2006 y abril de 2007. Los materiales vegetales se identificaron y clasificaron con la guía del estudiante que es el libro Flora de Egipto (Tackholm 1974) y se confirmaron por el Prof. Dr. Fath Allah Zieton, Profesor de Patología Vegetal, Facultad de Agricultura, Universidad de Alejandría, Egipto. Se han depositado especímenes de registro en el Departamento de Química de Pesticidas, Facultad de Agricultura, Universidad de Alejandría, Egipto.

**Aislamiento de los aceites esenciales.** Los materiales vegetales se secaron a temperatura ambiente durante cinco días. Se extrajeron los aceites esenciales mediante hidro-destilación en un aparato de tipo Clevenger durante 2 h. El aceite esencial crudo se secó sobre

sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4 °C para los análisis biológicos y los de GC-MS.

*Análisis de aceites esenciales mediante GC-MS.* Los aceites esenciales se diluyeron en dietil éter y se inyectó 1 µL en un cromatógrafo de gas (TRACE GC 2000, THERMO)/espectrometría de masa (SSQ 7000, FINNIGAN) (GC/MS). La columna GC fue una columna v de 60 m (0.25 mm i.d.) DB-5 (5% fenil) Metilpolisiloxano x. Las condiciones de la GC fueron las siguientes: temperatura del inyector 220 °C, temperatura de la columna isotérmica a 40 °C durante 2 min, después se programó a 250 °C/2min y se mantuvo a esta temperatura durante 2 min, la temperatura de la fuente de ion fue 200 °C. Se utilizó Helim como portador de gas a una tasa de 1 mL/min. El efluente de la columna de la GC se introdujo directamente en la fuente de ion de la MS. Se obtuvieron espectros en el modo EI con energía de ionización de 70 eV. El analizador de la masa de sector se ajustó a modo escáner desde 40 hasta 400 amu durante 5 s.

*Tratamientos.* Se agregaron diferentes niveles del aceite esencial de cítrico (0, 25, 50 y 75 µL/75 mL fluido ruminal buferado) o el limoneno (0, 30, 45 y 60 µL/75mL fluido ruminal buferado) a la muestra de la dieta. Se adicionó cada concentración a los frascos que contenían 75 mL de fluido ruminal buferado y 0.5 g del sustrato. Se utilizó la ración total mezclada (50 % alimento fibroso (heno Tifton): 50 % concentrado) como sustrato incubado con fluido ruminal buferado (2:1, v/v) en frascos de suero de 160 mL durante 24 h. La composición química de la ración total mezclada fue 922.4, 131.0, 718.0, 343.0 y 20.0 g kg<sup>-1</sup> para la materia seca, la proteína bruta, la fibra neutro detergente, la fibra ácido detergente y el extracto etéreo, respectivamente.

*Donantes de inóculo y preparación.* Cinco ovejas adultas canuladas en el rumen que pastaban gramíneas tropicales y estaban suplementadas con harina de maíz y soya (0.7 kg/100 kg de peso vivo, 20 % proteína bruta), además de con una mezcla mineral, se emplearon como donantes de inóculo. Se recolectaron los contenidos ruminales sólidos y líquidos (50 % sólido: 50 % líquido) antes de la alimentación matutina a través de la cánula usando una sonda de acero inoxidable (2.5 mm tamiz) ajustada a una jeringuilla de gran capacidad. Los líquidos y los sólidos se colocaron en frascos aislados pre-calentados (39 °C) y se transportaron en condiciones anaeróbicas al laboratorio. La mezcla de contenidos ruminales se filtró a través de cuatro capas de gasa y se mantuvo en baño de agua a 39 °C con saturación de CO<sub>2</sub> hasta que tuvo lugar la inoculación. La sustancia tampón y el inóculo se mezclaron (2:1 v/v) y se mantuvieron en baño de agua a 39 °C con saturación de CO<sub>2</sub> hasta su transferencia a los frascos.

*Producción de gas in vitro.* El experimento de producción de gas *in vitro* (PG) se llevó a cabo usando un transductor de presión y un capturador de datos (LANA/CENA-USP, Piracicaba/SP, Brasil) para medir el gas

producido en frascos de suero de 160 mL incubados a 39 °C (Mauricio *et al.* 1998). Las muestras molidas (0.5 g como alimento) se incubaron en 75 mL de fluido ruminal diluido (25 mL fluido ruminal mezclado + 50 mL de medio buferado de Menke) en frascos de suero (Longo *et al.* 2006). Una vez llenos, todos los frascos se sellaron con tapas de goma, se agitaron y se colocaron en la incubadora a 39 °C. Los frascos se agitaron manualmente después de registrar la presión del gas de la superficie a las 12 y 24 h de incubación mediante un transductor de presión (Theodorou *et al.* 1994). Se calculó la cantidad de la PG en cada horario de medición según la ecuación de regresión obtenida en nuestro sistema y en nuestras condiciones a partir de datos no publicados de 500 muestras para el volumen de gas versus la presión:  $PG \text{ (mL)} = 0.0112 \text{ psi}^2 + 7.3358 \text{ psi}$  ( $r^2=0.98$ ).

Se realizaron tres corridas. Los frascos de cada corrida fueron: cuatro, que incluyeron solo fluido ruminal buferado, incubados y considerados como blanco; cuatro, para el sustrato sin aditivo; cuatro, para cada concentración de AE; y cuatro, para el heno Tifton como un estándar interno para corregir la variación entre las corridas. Los valores de gas se expresaron como mL por g de MS incubada.

*Emisión de metano y análisis.* Las muestras de gas se tomaron de los frascos mediante una jeringuilla (5.0 mL cada vez y se acumularon en tubos vacutainer) dos veces a las 12 y 24 h de incubación para los análisis de metano. La determinación de metano se realizó en un cromatógrafo de gas Shimadzu 2014 equipado con un detector de conductividad térmico. La separación se logró usando la columna micro Shincarbon ST, el helio fue el portador de gas con una tasa de flujo de 10.0 mL/min. El detector y la temperatura de la columna fueron 250 y 60 °C, respectivamente. Las pruebas de linealidad y calibración se lograron mediante la curva de gas estándar en el rango de concentración probable de las muestras. La producción de metano al final del período de incubación se estimó a partir del volumen de gas y los datos de composición de gases como « $CH_4 = [PG + ES] \times Conc$ »; donde CH<sub>4</sub> es el volumen (mL) de metano, PG es el volumen (mL) de gas producido al final de la incubación, ES es el volumen del espacio de la parte superior (mL) del frasco de suero y Conc es el porcentaje de metano en la muestra de gas analizada (Tavendale *et al.* 2005).

*Degradación, factor de fraccionamiento, N-amoníacal y conteo de protozoos.* Luego de finalizada la incubación a las 24 h, se utilizó el contenido de dos frascos para determinar la digestibilidad verdadera de las materias seca y orgánica (DVMS, DVMO) sin α-amilasa y el factor de fraccionamiento (FF) como un índice de eficiencia de la proteína microbiana. El contenido de los frascos se transfirió cuantitativamente a un beaker de 600 mL con un total de 70 mL de solución ND (doble potencia, Van Soest *et al.* 1991 y Blummel y Becker 1997) y se sometió a reflujo por 3 h a 105 °C. Se determinó la MS residual y las cenizas. El factor de

fraccionamiento (FF) es la tasa entre los mg de materia orgánica realmente degradada y el volumen de gas (mL) a las 24 h de incubación (Blummel y Becker 1997 y Blummel *et al.* 1997).

Se usó el contenido de otros dos frascos para determinar la concentración de NH<sub>3</sub>-N y el conteo de protozoos. La concentración de NH<sub>3</sub>-N se midió según Preston (1995). Los protozoos se contaron microscópicamente siguiendo el procedimiento de Kamra *et al.* (1991). Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se calcularon de acuerdo con Getachew *et al.* (2002).

**Análisis estadístico.** Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), mediante el procedimiento General Linear Model del paquete de SAS (2002). El modelo usado fue:  $Y = \mu + F_i + e$ , donde  $\mu$  es la media general, y  $F_i$  el efecto del tratamiento. Las unidades experimentales fueron las corridas y las réplicas en la misma corrida se consideraron como repeticiones. Se identificaron las diferencias significativas entre las medias individuales mediante la prueba de Tukey (SAS 2002).

### Resultados y Discusión

Los perfiles químicos por GC-MS del aceite esencial de cítrico extraído de plantas egipcias se muestran en la tabla 1. Los análisis de los aceites esenciales de cítricos mostraron que los componentes principales fueron dl-limoneno (83.9 %) y  $\alpha$ -terpineno (10.75 %). También, el aceite esencial de cítrico tiene trazas de  $\alpha$ -pineno (1.44 %), sabineno (0.97 %), mirceno (0.71 %) y  $\gamma$ -terpinoleno (0.30 %).

Tabla 1. Constituyentes principales (%) del aceite esencial de cítrico egipcio

Componente	RT (min)	<i>Citrus reticulata</i>
$\alpha$ -Pineno	10.72	1.44
Sabineno	12.25	0.97
Mirceno	12.84	0.71
$\alpha$ -Terpinoleno	13.69	0.30
dl-Limoneno	14.13	83.93
$\gamma$ -Terpineno	15.07	10.75

El efecto de los diferentes niveles (0, 25, 50 y 75  $\mu$ L/75mL de fluido ruminal buferado más 500 mg de la ración total mezclada) del aceite esencial de cítrico o del limoneno (0, 30, 45 y 60  $\mu$ L/75mL de fluido ruminal buferado más 500 mg de ración total mezclada) en la producción *in vitro* de gas y metano durante 24 h de incubación se presenta en la tabla 2. Hubo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la producción de gas (PG) acumulativa luego de sustituir el volumen de gas del blanco por diferentes niveles de aceite esencial. Todos los niveles de aceite esencial de cítrico y limoneno disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) la PG, comparados con el sustrato sin aditivo. La suplementación del aceite esencial de cítrico disminuyó linealmente la PG con el nivel creciente de suplementación desde 10.5 hasta 34.7 %. Los aceites esenciales y los extractos vegetales se han usado por muchos miles de años (Jones 1996) para la preservación de los alimentos, en farmacia, medicina alternativa y terapias naturales (Reynolds 1996 y Lis-Balchin y Deans 1997). La actividad microbiana de los aceites esenciales se atribuye a un número de metabolitos vegetales secundarios, que incluyen saponinas, terpenoides y fenilpropanoides, presentes en la fracción de aceite esencial de muchas plantas. Los principales componentes bioactivos del aceite esencial de cítrico son dl-limoneno (83.9 %) y  $\alpha$ -terpineno (10.75 %) que pueden ser afectados negativamente por la actividad de los microorganismos del rumen. La reducción de la PG y la producción de metano se puede deber a que estos compuestos también disminuyeron el conteo de protozoos. Puede haber potencial para seleccionar compuestos de AE que reduzcan el metano, inhibiendo de forma selectiva el número de protozoos, que se puede esperar disminuyan la producción de metano porque los protozoos ruminales suministran un hábitat para los metanógenos que viven sobre y dentro de ellos.

La inclusión de L<sub>30</sub>, L<sub>45</sub> o L<sub>60</sub> redujo ( $P < 0.05$ ) la PG en 11.4, 23.6 y 22.3 %, respectivamente. La segunda y la tercera dosis de aceite esencial de cítrico o de limoneno disminuyeron ( $P < 0.05$ ) la emisión de metano cuando se expresó en base de materia seca, pero, cuando se ex-

Tabla 2. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales en la producción de gas (PG, mL/g MS) y de metano *in vitro* para la incubación de 24 h

Tratamientos	Niveles	PG	% cambio	CH <sub>4</sub> (mL/g MS)	CH <sub>4</sub> (mL/g DVMO)
Sin aditivo	-	137.2 <sup>a</sup>	-	10.3 <sup>ab</sup>	17.8 <sup>abc</sup>
Aceite esencial de cítrico	CR <sub>25</sub>	122.8 <sup>b</sup>	10.5	10.1 <sup>ab</sup>	18.1 <sup>c</sup>
	CR <sub>50</sub>	105.7 <sup>c</sup>	23.0	8.6 <sup>c</sup>	19.0 <sup>bc</sup>
	CR <sub>75</sub>	89.6 <sup>d</sup>	34.7	6.8 <sup>d</sup>	13.3 <sup>d</sup>
Limoneno	L <sub>30</sub>	121.5 <sup>b</sup>	11.4	11.8 <sup>a</sup>	22.0 <sup>a</sup>
	L <sub>45</sub>	104.8 <sup>c</sup>	23.6	8.2 <sup>c</sup>	20.2 <sup>ab</sup>
	L <sub>60</sub>	106.6 <sup>c</sup>	22.3	9.2 <sup>bc</sup>	21.3 <sup>a</sup>
EEM $\pm$		7.5	-	0.89	1.53

<sup>abcd</sup> Medias con diferentes superíndices, en una columna, son diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).  $\pm$  EEM: error estándar de la diferencia entre las medias

presó en base de materia orgánica digerida, solo la tercera dosis del aceite esencial de cítrico disminuyó ( $P < 0.05$ ) la emisión *in vitro* de metano. La inhibición de la producción de metano trajo aparejada una reducción significativa del conteo de protozoos. El limoneno es el monoterpeno monocíclico más abundante en el limón (*Citrus limonum*), la naranja (*Citrus aurantium*), la toronja (*Citrus paradisi*), la menta (*Mentha piperita*), la menta verde (*Mentha spicata*), y en otros aceites (Turner *et al.* 1999). Dorman y Deans (2000) demostraron la actividad antimicrobiana del limoneno, fundamentalmente contra bacterias gram-negativas. Castillejos *et al.* (2006) plantearon que el limoneno a 50 y 500 mg/L redujo la concentración total de AGV (-4.5 y -5.6%, respectivamente), lo que sugiere que estas dosis eran tóxicas para las bacterias del rumen. Además, el limoneno a 500 mg/L redujo el N amoniacal (-14.6%) y las concentraciones de los AGV de cadena ramificada (-6.6%), lo que sugiere que se inhibió la desaminación de los AA (Allison *et al.* 1962).

El efecto de los diferentes niveles de los aceites esenciales de cítrico o el limoneno en la digestibilidad verdadera de la materia seca y orgánica (DVMS, DVMO, g/kg MS), el factor de fraccionamiento (FF), el conteo de protozoos, la concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  y los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) aparecen en la tabla 3. La inclusión del aceite esencial de cítrico o el limoneno afectó negativamente la digestibilidad verdadera de la materia seca y orgánica. Aunque la inclusión del aceite esencial de cítrico disminuyó la DVMS y la DVMO al compararlo con el control, esta reducción no fue significativa entre los niveles. Se usó el factor de fraccionamiento (FF) como índice de la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana *in vitro*. Una reducción en la degradabilidad del alimento por el aceite esencial de cítrico o el limoneno se podría deber a los compuestos fenólicos como los taninos, el óxido piperitone, óxido cis-piperitone,  $\gamma$ -muuroleno y  $\alpha$ -thujeno. La reducción de la digestibilidad es una función de la competencia entre las

tasas de digestión y de pasaje (Van Soest 1994). El grado de inhibición depende, sin embargo, de la estructura química del compuesto de AE agregado. De los compuestos evaluados, los monoterpenos oxigenados, particularmente los alcoholes monoterpenos y los aldehídos, inhibieron fuertemente el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos ruminales, mientras que los hidrocarburos monoterpenos lo inhibieron ligeramente y, a veces, estimularon la actividad de los microorganismos ruminales. De hecho, el monensin afecta solo algunas bacterias gram-positivas, mientras que los aceites esenciales inhiben las bacterias gram positivas y gram-negativas (Helander *et al.* 1998). En concordancia con nuestros resultados, varios estudios observaron que la adición de aceites esenciales mezclados disminuyó la degradabilidad efectiva y la tasa de la degradación ruminal de algunos suplementos proteicos (Molero *et al.* 2004 y Newbold *et al.* 2004).

No hubo efecto significativo de los aceites esenciales de cítrico en el FF, mientras que la suplementación de limoneno disminuyó ( $P < 0.05$ ) los valores del FF. El conteo de protozoos se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ) con la suplementación de la segunda y la tercera dosis de aceite esencial de cítrico, mientras todas las dosis de limoneno redujeron el conteo de protozoos significativamente ( $P < 0.05$ ). La concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  se redujo drásticamente con la inclusión de altos niveles de cítrico o de limoneno. Los AGCC se redujeron linealmente ( $P < 0.05$ ) con el nivel creciente de suplementación de aceite esencial de cítrico.

Las bacterias ruminales gram-positivas participan en procesos de fermentación que producen, entre otros productos finales, acetato, butirato, formiato, lactato, hidrógeno, y amoníaco. Por otro lado, las bacterias ruminales gram negativas participan en procesos de fermentación asociados con la producción de propionato y succinato (Russell y Strobel 1989). Se puede inferir entonces que el patrón de fermentación observado en los AE está mediado por una mayor inhibición de las bacterias

Tabla.3 Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales en el factor de fraccionamiento (FF, mg materia orgánica realmente digerida/mL gas a 24 h), degradabilidad de materia seca y orgánica (DMS, DMO), conteo de protozoos ( $\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ ), concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mg/L) y ácidos grasos de cadena corta esperados (AGCC, mM).

Tratamientos		DVMS	DVMO	FF	Protozoos	$\text{NH}_3\text{-N}$	AGCC
Sin aditivo	-	591.0 <sup>a</sup>	555.0 <sup>a</sup>	3.5 <sup>ab</sup>	5.25 <sup>a</sup>	119.2 <sup>ab</sup>	63.4 <sup>a</sup>
Aceite esencial de cítrico	CR <sub>25</sub>	515.0 <sup>b</sup>	480.0 <sup>b</sup>	3.8 <sup>ab</sup>	5.10 <sup>ab</sup>	112.5 <sup>b</sup>	54.4 <sup>b</sup>
	CR <sub>50</sub>	462.0 <sup>b</sup>	451.0 <sup>c</sup>	3.3 <sup>b</sup>	3.38 <sup>c</sup>	109.9 <sup>bc</sup>	46.8 <sup>c</sup>
	CR <sub>75</sub>	473.0 <sup>b</sup>	457.0 <sup>c</sup>	4.0 <sup>a</sup>	3.38 <sup>c</sup>	89.1 <sup>d</sup>	39.7 <sup>d</sup>
Limoneno	L <sub>30</sub>	483.0 <sup>b</sup>	474.0 <sup>b</sup>	3.1 <sup>b</sup>	2.78 <sup>d</sup>	115.9 <sup>b</sup>	53.9 <sup>b</sup>
	L <sub>45</sub>	318.0 <sup>c</sup>	310.0 <sup>d</sup>	2.3 <sup>c</sup>	2.70 <sup>d</sup>	126.0 <sup>a</sup>	46.4 <sup>c</sup>
	L <sub>60</sub>	292.0 <sup>c</sup>	287.0 <sup>d</sup>	1.9 <sup>d</sup>	3.15 <sup>c</sup>	104.0 <sup>c</sup>	47.2 <sup>c</sup>
EEM $\pm$		12.4	11.6	0.11	0.21	4.6	2.3

<sup>abcd</sup> Medias con diferentes superíndices, en una columna, son diferentes (prueba de Tukey,  $P < 0.05$ ).

$\pm$  EEM: error estándar de la diferencia entre medias

ruminales gram negativas, en comparación con el monensin que inhibe fundamentalmente las bacterias ruminales gram-positivas.

La reducción del N amoniacal en este estudio sugirió que el aceite esencial de cítrico redujo la desaminación de aminoácidos, según indicó Broderick y Balthrop (1979) con el timol. La inhibición de la desaminación de los aminoácidos tiene implicaciones prácticas porque puede aumentar el escape ruminal de proteína dietética y mejorar la eficiencia de la utilización del N en el rumen (Van Nevel y Demeyer 1988). Un hallazgo consistente cuando se suministra saponinas a rumiantes es una reducción en la concentración de N amoniacal ruminal (Wallace *et al.* 1994 y Hristov *et al.* 1999). Estos efectos se han atribuido generalmente a la pronunciada actividad antiprotozoaria de las saponinas (Francis *et al.* 2002), y a los protozoos que son los productores primarios de amoníaco en el rumen. Sin embargo, la concentración ruminal de N amoniacal se puede incrementar (Hristov *et al.* 1999) o reducir (Devant *et al.* 2000) en dependencia de la cantidad de proteína degradable y de la cantidad y tipos de carbohidratos dietéticos disponibles para uso microbiano (Russell *et al.* 1983).

En correspondencia con nuestros resultados, Nagy *et al.* (1964), Nagy y Tengerdy (1968) y Dziba *et al.* (2006) revelaron que los efectos antibacterianos de los terpenos afectan negativamente la fermentación ruminal, la digestibilidad de la materia seca, y el valor nutritivo, retardan la fermentación *in vitro* de celulosa y reducen la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). En oposición a los hallazgos anteriores que sugerían que el sagebrush (rico en terpenos) inhibe la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (Ngugi *et al.* 1995), la adición de terpenos a la dieta basada en cebada o a la dieta basada en pulpa de remolacha incrementó la digestibilidad de la materia seca, la fibra neutro detergente, y la fibra ácido detergente, pero redujo las concentraciones de AGV totales y de acetato ( $P < 0.05$ ) (Villalba *et al.* 2006). Los terpenos también disminuyeron la concentración de butirato en la dieta basada en cebada ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones de propionato no fueron afectadas por los terpenos en ninguna de las dietas.

Se concluye que el aceite esencial de cítrico tiene el potencial de afectar la eficiencia de la fermentación ruminal y pudiera ser un agente promisorio para mitigar el metano, lo que es atribuido a su alto contenido de limoneno. Este estudio sugiere llevar a cabo experimentos *in vivo* a largo plazo para investigar el efecto potencial del aceite esencial de cítrico en la fermentación microbiana ruminal y la emisión de metano.

#### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Third World of Academic Science (TWAS), el Consejo Nacional para el Desarrollo Científico y Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development, CNPq) y la Fundação de Amparo à Pesquisa del Estado de São Paulo (FAPESP).

#### Referencias

- Allison, M. J., Bryant, M.P. & Doestch, R.N. 1962. Studies on the metabolic function of branched-chain volatile fatty acids, growth factors for ruminococci. I. Incorporation of isovalerate into leucine. *J. Bacteriol.* 83:523
- Blummel, M. & Becker, K. 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibre as described by *in vitro* gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br. J. Nutr.* 77:757
- Blummel M., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 1997. *In vitro* gas production - a technique revisited. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 77:24
- Broderick, G.A. & Balthrop, J.E. 1979. Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 49:1101
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. & Ferret, A. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 90:2580
- Cardozo, P., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2004. Effects of natural plant extracts on protein degradation and fermentation profile in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230
- Castillejos, L., Calsamiglia, S. & Ferret, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow *in vitro* systems. *J. Dairy Sci.* 89:2649
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. 2005. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:29
- Conner, D.E. 1993. Naturally occurring compounds. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.), *Antimicrobials in Foods*. Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 441–468
- Devant, M., Ferret, A., Gasa, J., Calsamiglia, S. & Casals, R. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88:308
- Dziba, L.E., Hall, J.O. & Provenza, F.D. 2006. Feeding behavior of lambs in relation to kinetics of 1,8-cineole dosed intravenously or into the rumen. *J. Chem. Ecol.* 32:391
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: Reviews. *Br. J. Nutr.* 88:587
- Getachew, G., Makkar, H.P. S. & Becker, K. 2002. Tropical browses: content of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acids and *in vitro* gas production. *J. Agric. Sci. Cambridge* 139:341
- Greathead, H. 2003. Plant and plant extract for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* 62:279
- Helander, I.M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. & Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential

- oil components on gram-negative bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46:3590
- Hristov, A.N., McAllister, T.A., Van Herk, F.H., Cheng, K.-J., Newbold, C.J. & Cheeke, P.R. 1999. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. *J. Anim. Sci.* 77:2554
- Jones, F.A. 1996. Herbs—useful plants. Their role in history and today. *Euro. J. Gastroenterol. Hepatol.* 8:1227
- Kamra, D.N., Sawal, R.K., Pathak, N.N., Kewalramani, N. & Agarwal, N. 1991. Diurnal variation in ciliate protozoa in the rumen of blackbuck (*Antelope cervicapra*). *Lett. Appl. Microbiol.* 13:165
- Lis-Balchin, M. & Deans, S.G. (1997). Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 82:759
- Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S. & Theodorou, M.K. (1998). Semi automation of the *in vitro* gas production technique using a pressure transducer. Annual Meeting of the British Society of Animal Science, Scarborough, Penicuik: BSAS, p.70.
- Molero, R., Ibars, A., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Losa, R. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:91
- Nagy, J. W., Steinhoff, H. W. & Ward, G. M. 1964. Effects of essential oils of sagebrush on deer rumen microbial function. *J. Wildl. Manag.* 28:785
- Nagy, J. W., Tengerdly, R. P. 1968. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of the volatile oils of *Artemisia tridentata* (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. *Appl. Microbiol.* 16: 441
- Ngugi, R. K., F. C. Hinds, & J. Powell. 1995. Mountain big sagebrush browse decreases dry matter intake, digestibility, and nutritive quality of sheep diets. *J. Range Manage.* 48:487
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R. & Wallace, R.J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:105
- Preston, T.R. 1995. Biological and chemical analytical methods. En: Preston, T.R. *Tropical Animal Feeding: a manual for research workers*. Rome:FAO, 1995. chap.9, p. 191
- Reynolds, J.E.F. 1996. *Martindale—the Extra Pharmacopoeia*. 31<sup>st</sup> edition. London. Royal Pharmaceutical Society of Great Britain
- Russell, J.B., Sniffen, C.J. & Van Soest., P.J. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763
- Russell, J.B. & Strobel, H.J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1
- SAS 2002. *SAS users guide Statistical analyses systems institute*. Cary, USA
- Tackholm, V. 1974. *Student Flora of Egypt*, 2<sup>nd</sup> Edition. Cairo University Press, Beirut, Lebanon, p. 581
- Tavendale, M.H., Meahger, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.G. & Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Tech.* 123-124, 403-419
- 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. *Anim. Feed Sci. Tech.* 48:185
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E.E., Froehlich, J.E. & Croteau, R. 1999. Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiol.* 120:879
- Van Nevel, C.J. & Demeyer, D.I. 1988. Manipulation of rumen fermentation. En: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science, London, UK, P. 387
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2<sup>nd</sup> Ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, NY
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583
- Villalba, J.J., Provenza, F.D. & Olson, K.C. 2006. Terpenes and carbohydrate source influence rumen fermentation, digestibility, intake, and preference in sheep. *J. Anim. Sci.* 84:2463
- Wallace, R.J., Arthaud, L. & Newbold, C.J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* [sic] extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1762

**Recibido: 12 de diciembre de 2009**