

## Uso de extractos etanólicos de *Schinus longifolius* (Molle) y *Eucalyptus grandis* (Eucalipto) para modular la fermentación *in vitro* y la degradación proteica estimada por la concentración de N amoniacal



## Use of Ethanol Extracts of *Schinus longifolius* (Molle) and *Eucalyptus grandis* (Eucalipto) to Modulate the *in vitro* Fermentation and Protein Degradation Estimated by the Concentration of Ammonia N

Santana, A.<sup>1</sup>, Ríos, J.A.<sup>1</sup>, González, M.<sup>3</sup>, Cerecetto, H.<sup>3</sup>, Cajarville, C.<sup>2</sup>, Repetto, J.L.\*<sup>1</sup>

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de extractos etanólicos de Molle (*Schinus longifolius*, MO) o de Eucalipto (*Eucalyptus grandis*, EU) sobre la fermentación ruminal *in vitro*. Se utilizó un arreglo factorial 3×6, combinando los efectos de inclusión de dos extractos (dosis 1000 mg/L) y un control sin extracto añadidos sobre seis concentrados proteicos (harina de soja, harina de girasol de 34% y 31% de Proteína Cruda, harina de canola, granos y solubles de destilería del maíz y harina de guar) utilizados como sustrato. Cada una de las combinaciones se incubó por triplicado en líquido ruminal. Se determinó la producción de gas acumulada a las 12 h (PG<sub>12</sub>) y el pH y la concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) del líquido a las 4 h de incubación. El extracto de MO disminuyó la PG<sub>12</sub> en las harinas de girasol y el extracto de EU en la harina de canola (P < 0,05). El pH disminuyó con el agregado de MO en dos sustratos (harina de soja y harina de canola) (P < 0,05). El extracto de EU no afectó el pH. La concentración de N-NH<sub>3</sub> disminuyó con el agregado de EU (P < 0,05). El extracto etanólico de Eucalipto mostró cualidades como modulador de la fermentación ruminal, disminuyendo la degradación de las materias nitrogenadas. El extracto etanólico de Molle controló la fermentación de las harinas de girasol.

**Palabras clave:** fitoextractos, aditivos, suplementos proteicos

### SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of ethanol extracts of Molle (*Schinus longifolius*, MO) and Eucalyptus (*Eucalyptus grandis*, EU) on ruminal fermentation *in vitro*. We used a 3 × 6 factorial arrangement, combining the effects of inclusion two extracts (dose 1000 mg/mL) and control without extract added on six protein concentrates (soybean meal, sunflower meal 34% and 31% crude protein, canola meal, grains and corn distillers soluble and guar meal) used as substrate. Each of the combinations was incubated in triplicate in rumen fluid. We determined the cumulative gas production at 12 h (PG<sub>12</sub>) and the pH and ammonia nitrogen concentration (N-NH<sub>3</sub>) of the liquid at 4 h of incubation. Molle extract decreased the PG<sub>12</sub> in sunflower meal and EU extract in canola meal. The pH decreased in two substrates with the addition of MO. Eucalyptus extract did not modify the pH. The N-NH<sub>3</sub> concentration decreased with the addition of EU. The ethanol extract of Eucalyptus showed qualities as a modulator of ruminal fermentation, reducing the degradation of nitrogenous substances. The ethanol extract of Molle controlled the fermentation of sunflower meal.

**Key words:** phyto-extracts, additives, protein supplements

### INTRODUCCIÓN

El uso de productos naturales en los sistemas productivos se ha visto favorecido por la creciente presión de los consumidores, reflejada en la legislación de diversos países o grupos de países como la Comunidad Económica Europea que limitan o prohíben el uso de agentes químicos sintéticos, antibióticos u otros (OJEU, 2003).

Existe consenso en la información disponible en cuanto a que los extractos vegetales afectan en forma variable la fermentación ruminal y la degradación de los compuestos nitrogenados (Hart y col., 2008; Benchaar y col., 2008). El aceite esencial de Eucalipto a dosis altas ha sido descrito como un potente inhibidor del crecimiento bacteriano y de la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) (Delaquis y col., 2002). El árbol de

Molle es una especie autóctona del sur de nuestro continente (Argentina, Brasil, Uruguay) con posible acción antimicrobiana (Agudelo y col, 2011) pero no estudiado en cuanto a su efecto sobre la fermentación ruminal.

Cuando se utilizan altos niveles de compuestos nitrogenados de rápida degradación en la dieta de los rumiantes el resultado inmediato es una alta concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en el rumen. Posteriormente estos exesos de N-NH<sub>3</sub> son eliminados por el organismo animal en forma de urea a través de la orina. Dicha forma de excreción del exceso de N-NH<sub>3</sub> producido en el rumen conlleva un costo energético (Reynal y Broderick, 2005) pudiendo además impactar negativamente en el medio ambiente (Van Horn y col., 1996; Hristov y col., 2011). La disminución de degradación de las materias nitrogenadas en

<sup>1</sup> Departamento de Producción de Bovinos, Facultad de Veterinaria. UdelaR, Uruguay.

\*Autor de contacto: Lasplacas 1550, Montevideo CP 11600, Uruguay, Telefax: 2 6280890. Correo electrónico: joselorepetto@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Nutrición Animal, Facultad de Veterinaria. UdelaR, Uruguay.

<sup>3</sup> Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias. UdelaR, Uruguay.

Recibido: 14/5/12 Aprobado: 21/6/12

general resulta en niveles más bajos de N-NH<sub>3</sub> ruminal, disminuyendo así la excreción urinaria de nitrógeno (N) (Bohnert y col., 2002). Esta estrategia, que deriva en un aumento de la proporción de proteína no degradable en el rumen, podría eventualmente aumentar el N excretado a través del estiércol. Este último es mucho menos propenso a la volatilización y lixiviación que el excretado por la orina, disminuyendo así el impacto medioambiental del uso de dietas con cantidades relativamente altas de N (Van Horn y col., 1996). Es de interés, por lo tanto, buscar productos que modulen el proceso fermentativo y específicamente la degradación del N a nivel ruminal, para disminuir los costos energéticos y medioambientales derivados de la excreción de N a través de la orina. Una posibilidad, es utilizar extractos vegetales capaces de modular el proceso fermentativo a nivel de rumen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de extractos etanólicos de *Schinus longifolius* (Molle) o *Eucalyptus grandis* (Eucalipto) sobre la fermentación *in vitro* de concentrados proteicos con diferente degradabilidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento consistió en un arreglo factorial 3×6, combinando los efectos de inclusión de dos extractos etanólicos, uno de Molle (*Schinus longifolius*, **MO**) y el otro de Eucalipto (*Eucalyptus grandis*, **EU**), y un control sin extracto (**CON**) añadidos sobre seis concentrados proteicos utilizados como sustrato en un experimento de fermentación *in vitro*. Los extractos se incluyeron a dosis de 1000 mg/L, considerada una dosis media de acuerdo con Benchaar y col. (2008) y Hart y col.

(2008) quienes establecen dosis de 4000 a 5000 mg/L como altas y de 50 a 500 mg/L como bajas.

## Extractos y sustratos

El extracto etanólico de MO se obtuvo a partir de 115,5 g de frutos inmaduros y hojas verdes. El extracto etanólico de EU se obtuvo a partir de 55,0 g de hojas verdes. En ambos casos el material vegetal se maceró con 350 mL de etanol × 3 veces durante 24 h cada una a temperatura ambiente, en oscuridad, obteniéndose 1050 mL de extracto etanólico que se destiló en un evaporador rotatorio (Labotec) a una temperatura de 40 °C. De esta forma se obtuvieron 23,5 g de extracto seco de MO (rendimiento 20%) y 16,6 g de extracto seco de EU (rendimiento 30%). En los experimentos de fermentación la dosis de extracto etanólico utilizada fue de 50 mg/frasco contenido en un volumen total de 50 mL (1000 mg/L). Como sustratos se utilizaron seis concentrados proteicos: harina de soja (HS), dos harinas de girasol (34% (HGa) y 31% (HGb) de proteína cruda), harina de canola (HC), granos y solubles de destilería del maíz (DDGS) y harina de guar calidad «Korma» (GM) (Bhansali international, E-375 Marudhara Industrial Area, Basni Phase II Jodhpur - 342005 INDIA). Los sustratos se molieron (<1mm) y para cada uno se analizó materia seca (MS), cenizas (Cen), proteína cruda (PC) y el extracto al éter (EE) según AOAC (1990); los contenidos de fibra neutro detergente (FDN) y fibra ácido detergente (FDA) se analizaron según Goering y Van Soest (1970). Además se realizó el fraccionamiento de los compuestos nitrogenados según el método propuesto por Licitra y col. (1996). En el cuadro 1 se presenta la composición química de los sustratos.

**Cuadro 1.** Composición química de los distintos sustratos

	<b>HS</b>	<b>HGa</b>	<b>HGb</b>	<b>HC</b>	<b>DDGS</b>	<b>GM</b>
MS (%)	92,8	92,8	92,6	92,2	90,2	94,7
<b>% de la MS</b>						
FDN	14,4	36,1	43,1	31,6	34,9	12,6
FDA	7,2	24,9	29,2	14,7	8,3	1,7
CNE	23,6	19,9	17,6	18,1	26,3	21,6
EE	2,7	2,8	1,9	1,7	9,4	7,3
Cen	8,0	7,3	6,7	6,5	3,7	6,2
PC	51,3	33,9	30,7	42,1	25,7	52,3
<b>% de la PC</b>						
NNP	17,7	25,0	28,0	16,7	21,0	13,2
NPS	34,0	32,4	38,1	36,5	25,3	60,6
NIDN	9,4	14,0	11,0	17,4	18,9	10,8
NIDA	4,1	6,6	6,5	5,0	5,1	0,9

MS, Materia seca; PC, Proteína cruda; FDN, Fibra insoluble en detergente neutro; FDA, Fibra insoluble en detergente ácido; CNE, Carbohidratos no estructurales; EE, Extracto al éter; Cen, Cenizas; PC, Proteína cruda; NNP, nitrógeno no proteico; NPS, nitrógeno y proteína soluble en solución tampón de fosfato-borato; NIDN, nitrógeno insoluble en detergente neutro; NIDA, nitrógeno insoluble en detergente ácido. HS, harina de soja; HGa, harina de girasol 34 % PC; HGb, harina de girasol 31 % PC; HC, harina de canola; DDGS, granos de destilería y solubles; GM, Harina de guar calidad «Korma».

## MONTAJE DE LABATERÍA *IN VITRO*

Se colocaron 0,5 g de cada uno de los sustratos molidos (criba de 1 mm) en frascos de vidrio de 125 mL. A cada frasco se le adicionaron 36 mL de medio de incubación propuesto por Lowe y col. (1985), 2 mL de solución de bicarbonato de sodio al 8,2 % en agua destilada (p/v) y 0,5 mL de una solución de sulfuro de sodio nohidratado en agua destilada al 2,05 % (p/v). Se eliminó el aire del interior de los frascos mediante una corriente de dióxido de carbono e inmediatamente se taparon con tapones de goma. Los frascos con el sustrato y el medio permanecieron a 4 °C durante 12 h antes de la inoculación para permitir la hidratación del sustrato. Como inóculo se utilizó líquido ruminal extraído de una vaca Holando en lactación, provista con una cánula ruminal, consumiendo por día (base seca) 9,2 kg de pastura de alfalfa (*Medicago Sativa*), 2,9 kg de afrechillo de trigo y 1,2 kg de grano húmedo de maíz ensilado. El líquido se extrajo manualmente y fue filtrado a través de cuatro capas de paño de quesería, en un recipiente térmico previamente precalentado a 39 °C e inmediatamente fue trasladado al laboratorio para su utilización. Media hora antes de la inyección del inóculo los frascos fueron colocados en un baño, incubados a 39 °C donde permanecieron hasta el final del período de incubación. Inmediatamente antes de inocular el líquido ruminal se agregaron 2 mL de medio de incubación al tratamiento CON conteniendo 50 mg de extracto etanólico de EU o MO según correspondiera el tratamiento. Luego se adicionaron 10 mL de líquido ruminal fresco siempre bajo gaseo de dióxido de carbono y se sellaron con tapón de goma y precinto de aluminio. En total fueron dieciocho tratamientos, con seis repeticiones (frascos) por tratamiento, tres de las cuales fueron abiertos a las 4 h para determinar el pH y la concentración de N-NH<sub>3</sub> en el líquido. Como blancos se incubaron 6 frascos sin sustrato ni extractos y 12 sin sustrato pero con extracto (seis conteniendo MO y seis EU). Utilizándose los blancos para la corrección de los valores de pH, PG<sub>12</sub> y N-NH<sub>3</sub> determinados en los tratamientos.

## Determinaciones y cálculos

La producción de gas por gramo de materia orgánica de sustrato acumulada a las 12 h de incubación (PG<sub>12</sub>) se determinó siguiendo

do el procedimiento descrito por Theodorou y col. (1994) y modificado por Mauricio y col. (1999). Se determinó la presión mediante un manómetro digital con transductor (Sper scientific LTD. Scottsdale, EE.UU.) cada 2 h desde la inoculación hasta las 12 h, dejando escapar el gas de los frascos luego de cada medición. Previo a las determinaciones se estableció la relación entre presión y volumen de gas, obteniéndose la ecuación:  $V \text{ (mL)} = 4,40 P \text{ (psi)} + 0,09 P^2 \text{ (psi)}$ ; donde: V es el volumen de gas y P la presión, con un coeficiente de regresión de  $R^2 = 0,998$ .

A las 4 h de incubación se abrieron 3 frascos por tratamiento en los que se determinó el pH del líquido mediante pHmetro digital (Oakton®). Además se extrajo una muestra de 10 mL del contenido de cada frasco, que fue conservada con 10 mL de cloruro de sodio al 20% y congelada a -20 °C. Posteriormente se analizó la concentración de N-NH<sub>3</sub> por destilación directa (FAO, 1986).

## Análisis Estadístico

Todos los datos se analizaron mediante ProcMixed del SAS System for Windows 9.0 ®.

El modelo estadístico utilizado para PG<sub>12</sub>, pH y NH<sub>3</sub> fue:

$$y_{ijk} = \mu + E_i + S_j + E_i \times S_j + e_{ij}$$

Siendo:

$y_{ijk}$  la variable en estudio;  $\mu$  la media;  $E_i$  el efecto del extracto medido en k frascos;  $S_j$  el efecto del sustrato;  $E_i \times S_j$  la interacción extracto por sustrato y  $e_{ijk}$  la sumatoria de errores.

Las medias se separaron mediante el test de Tukey. Las interacciones detectadas fueron desdobladas mediante el procedimiento «SLICE» del Sas System for Windows 9.0 ®.

## RESULTADOS

Para las tres variables estudiadas se detectaron efectos del sustrato, del extracto y en el caso de pH y PG<sub>12</sub> existieron además interacciones entre ambos efectos (Cuadro 2).

La concentración de N-NH<sub>3</sub> (Cuadro 2) fue mayor para las harinas de girasol (HG), de canola (HC) y la harina de goma guar (GM). El menor valor lo presentó el DDGS. Con respecto a los

**Cuadro 2.** Efecto de la adición de extractos, del sustrato y de la interacción entre ambos y principales efectos simples sobre la producción de gas, el pH y el nitrógeno amoniacal *in vitro*

	MO						EU						Control						ESM	p		
	HS	HGa	HGb	HC	DDGS	GM	HS	HGa	HGb	HC	DDGS	GM	HS	HGa	HGb	HC	DDGS	GM				
PG	167	135 <sup>a</sup>	136 <sup>a</sup>	165 <sup>b</sup>	128	130	174	159 <sup>ab</sup>	168 <sup>b</sup>	137 <sup>a</sup>	128	130	182	181 <sup>b</sup>	164 <sup>b</sup>	161 <sup>b</sup>	130	130	6,94	*	**	*
pH	6,3 <sup>a</sup>	6,4	6,3	6,3 <sup>a</sup>	6,2	6,4	6,4 <sup>ab</sup>	6,4	6,3	6,3 <sup>ab</sup>	6,2	6,4	6,4 <sup>b</sup>	6,3	6,5	6,4 <sup>b</sup>	6,2	6,4	0,01	*	**	*
NH <sub>3</sub>	2,1	2,2	2,8	2,8	1,2	2,0	1,9	2,7	2,3	2,3	0,8	1,8	1,7	2,8	3,0	2,7	1,2	2,7	0,26	*	**	ns

\* P < 0,05; \*\*P < 0,01; ns P > 0,05.

MO, extracto etanólico de «*Schinus longifolius*»; EU, extracto etanólico de «*Eucalyptus grandis*»; Control, sin extracto; PG, mL de gas producido por g de materia orgánica de sustrato a las 12 h de incubación (mL/g sustrato); pH, pH a las 4 h; NH<sub>3</sub>, g N-NH<sub>3</sub>/100 mL a las 4 h; ESM, Error Estándar de las Medias (ESM); E, efecto del extracto; S, efecto del sustrato; SxE, interacción extracto por sustrato.

HS, harina de soja; HGa, harina de girasol 34 % PC; HGb, harina de girasol 31 % PC; HC, harina de canola; DDGS, granos de destilería y solubles; GM, Harina de guar calidad «Korma».

Diferentes superíndices en una misma fila para un mismo sustrato difieren P < 0,01.

extractos añadidos, los materiales incubados con EU fueron los que presentaron menores concentraciones de N-NH<sub>3</sub> (P < 0,05), no detectándose diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con MO y el control (P = 0,47).

La inclusión de MO disminuyó la PG<sub>12</sub> en HGA y HGB (P < 0,01, ESM = 6,48) y el EU en HC (P < 0,01 ESM = 6,48). Al mismo tiempo, con el agregado de MO disminuyó el pH, en los sustratos de HS y de HC (P = 0,039; ESM 0,012), mientras que éste no se modificó con el agregado de EU (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

Varios trabajos reportan que a dosis altas (>2000 mg/L), diversos extractos vegetales como los de *Eucalyptus spp*, *Allium sativa*, *Cinnamomum cassia*, *Yucca schidigera*, *Origanum vulgare* y *Capsicum spp*, y compuestos puros obtenidos a partir de aceites vegetales como Carvacrol y Eugenol conducen a una disminución en los procesos de fermentación *in vitro* (Patra, 2011; Benchaar y col., 2007) disminuyendo la producción de gas (Jiménez-Peralta y col., 2011), así como el N-NH<sub>3</sub> y aumentando el pH (González y col., 2002; Cardozo y col., 2005; Busquet y col., 2006; Castillejos y col., 2008). Sin embargo a dosis de extractos como la utilizada en este estudio (≤ 1000 mg/L) las referencias bibliográficas no son concluyentes (Benchaar y col., 2007).

En este trabajo, la adición de EU disminuyó la producción de gas en concordancia con los resultados de Kumar y col. (2009), quienes trabajando con aceite esencial de *Eucalyptus globulus* a dosis de 0,33 a 1,66 µL/mL de medio de incubación describieron una disminución lineal de la producción de gas. Estos autores también evidencian una disminución paralela de la concentración de ácidos grasos volátiles. Esto no parece haber sucedido en el presente trabajo dado que no se observaron modificaciones en el pH, aunque es de resaltar que, el hecho de trabajar con un sistema *in vitro* implica el uso de sustancias tampón que podrían enmascarar este efecto.

Con respecto al MO la marcada disminución en la producción de gas observada cuando se incubó como aditivo de ambas harinas de girasol, no se registró ni siquiera a nivel de tendencia con otros sustratos, por lo que parece haber algún tipo de acción

específica sobre este tipo de sustrato. Se debe señalar que no existen descripciones anteriores en la literatura sobre la acción de este extracto, obtenido de la flora nativa Uruguaya.

Si bien se partió de sustratos con degradaciones muy diferentes, lo cual está reflejado tanto en el fraccionamiento químico de las materias nitrogenadas como en las concentraciones de N-NH<sub>3</sub>, el EU mostró una capacidad marcada y diferenciada de los otros tratamientos para disminuir la concentración de N-NH<sub>3</sub> independientemente del tipo de sustrato utilizado. La concentración de N-NH<sub>3</sub> está en relación directa con la degradación de los compuestos nitrogenados de los sustratos por parte de los microorganismos ruminales (Van Soest, 1994). La acción de EU sobre la concentración N-NH<sub>3</sub> podría estar explicada por una acción específica de este extracto sobre un grupo bacteriano denominado «Bacterias hiper productoras de amonio» (*Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium aminophilum*). La inhibición de este grupo podría resultar en una disminución de la desanimación de aminoácidos y de la concentración de N-NH<sub>3</sub> (Broderick y Balthrol, 1979; McIntosh y col., 2003; Molero y col., 2004; Cardozo y col., 2004). Este grupo bacteriano se encuentra en bajo número en el rumen pero es responsable de gran parte (hasta 50 %) de la desaminación (Russell y col., 1991). Si bien no se conocen trabajos que hayan estudiado la acción específica del Eucalipto sobre este grupo de bacterias, McIntosh y col. (2003) tratando cultivos bacterianos con 36 mg/L de una mezcla comercial de aceites esenciales provenientes de Eucalipto observaron una disminución de un 50 % en el crecimiento de *Clostridium sticklandii*.

## CONCLUSIONES

El extracto etanólico de Eucalipto mostró cualidades como modulador de la fermentación ruminal disminuyendo la degradación de las materias nitrogenadas sin afectar el pH. El extracto etanólico de Molle controló la fermentación de las harinas de girasol, aunque en este trabajo no pudo demostrarse su efecto sobre la degradación proteica. Las acciones demostradas por ambos extractos ameritan profundizar su estudio en cuanto a los principios activos actuantes, los mecanismos de acción y las concentraciones necesarias para evidenciar los efectos.

## Referencias Bibliográficas

1. Agudelo IJ, Wagner ML, Gurni AA, Ricco RA. (2011). Dynamic of polyphenolic compounds of *Schinus longifolius* Cabrera (Anacardiaceae) in response to infection by *Cecidosea eremita* Curtis (Lepidoptera: Cecidosidae). *Bol Soc Argent Bot* 46 (Supl.): 167.
2. AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). (1990). Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, USA. 1141 pp.
3. Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves G, Fraser G, Colombatto D, McAllister T. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim Feed Sci Technol* 145:209–228.
4. Benchaar C, Chaves A, Fraser G, Wang Y, Beauchemin K, McAllister T. (2007). Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. *Can J Anim Sci* 78:413–419.
5. Bohnert DW, Schauer CS, DelCurto T. (2002). Influence of rumen protein degradability and supplementation frequency on performance and nitrogen use in ruminants consuming low quality forage: Cow performance and efficiency of nitrogen use in wethers. *J Anim Sci* 80:1629–1637.
6. Broderick G, Balthrol JJ. (1979). Chemical Inhibition of Amino Acid Deamination by Ruminant Microbes *In Vitro*. *J Anim Sci* 49:1101–1111.
7. Busquet M, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. (2006). Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J Anim Sci* 89:761–771.
8. Cardozo P, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and

- fermentation profiles in continuous culture. *J Anim Sci* 82:3230-3236.
9. Cardozo W, Calsamiglia S, Ferret A, Kamel C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. *J Anim Sci* 83:2572-2579.
  10. Castillejos L, Calsamiglia S, Martín-Tereso T, Ter Wijlen H. (2008). *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Anim Feed Sci Technol* 145:259-270.
  11. Delaquis P.J, Stanich K, Girard B, Mazza G. (2002). Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Intl J Food Microbiol* 74:101-109.
  12. FAO, 1986: Analytical methods for characterizing feed resources for ruminants. In: Better utilization of crop residues and by-products in animal feeding: research guidelines 2.A practical manual for research workers. Retrieved October 8, 2007, from <http://www.fao.org/documents/en/detail/27299>.
  13. Goering HK, Van Soest PJ. (1970). Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture Handbook N° 379, USDA. Ed. U. S. Government Printing Office, Washington DC, U.S.A. 20 pp.
  14. González S, Pabón M, Carulla J. (2002). Effects of tannins on *in vitro* ammonia release and dry matter degradation of soybean meal. *Arch Latinoam Prod Anim* 10:97-101.
  15. Hart K, Yañez-Ruiz D, Duval S, McEwan N, Newbold C. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim Feed Sci Technol* 147:8-35.
  16. Hristov A, Hanigan M, Cole A, Todd R, McAllister T. (2011). Review: Ammonia emissions from dairy farms and beef feedlots. *Can J Anim Sci* 91:1-35.
  17. Jiménez-Peralta F, Salem A, Mejía-Hernández P, González-Ronquillo M, Albarrán-Portillo B, Rojo-Rubio R. (2011). Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. *Livest Sci* 136:192-200.
  18. Kumar R, Kamra DN, Agarwal N, Chaudhary LC. (2009). Effect of Eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) Oil on *in vitro* Methanogenesis and Fermentation of Feed with Buffalo Rumen Liquor. *Anim Nutr Feed Technol* 9:237-243.
  19. Licitra G, Hernandez TM, Van Soest PJ. (1996). Standardization of procedures for nitrogen fractionation or ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 57:347-358.
  20. Lowe SE, Theodorou MK, Trinci APJ, Hespell RB. (1985). Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. *J Gen Microbiol* 131:2225-2229.
  21. Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK. (1999). A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol* 79:321-330.
  22. McIntosh F, Williams P, Losa R, Wallace R, Beever D. (2003). Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Appl Environ Microbiol* 64:5011-5014.
  23. Molero R, Ibars M, 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* 114:91-104.
  24. OJEU (Official Journal of the European Union). 2003. REGLAMENTO (CE) No 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea del 22 de septiembre de 2003. *Diario Oficial de la Unión Europea sobre los aditivos en la alimentación animal*, pp. L268/36 en OJEU de 10/18/2003.
  25. Patra AK. (2011). Effect of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian J Anim Vet Adv* 6:416-428.
  26. Reynal S, Broderick G. (2005). Effect of Dietary Level of Rumen-Degraded Protein on Production and Nitrogen Metabolism in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 88: 4045-4064.
  27. Russell J, Onodera R, Hino T. (1991). Ruminal protein fermentation: New perspectives on previous contradictions. En: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Eds. Tsuda T, Sasaki Y, Kawashima R. Ed. London Academic Press Limited. pp 691-697.
  28. Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 48:185-197.
  29. Van Horn H, Newton G, Kunkle W. (1996). Ruminant Nutrition from an Environmental Perspective: Factors Affecting Whole-Farm Nutrient Balance1. *J Anim Sci* 74:3082-3102.
  30. Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Ed. Cornell University Press. 2° ed. New York 476 p.