

Efecto del extracto de *Syzygium aromaticum* L. sobre la fermentación y degradabilidad ruminal *in vitro*

Effect of *Syzygium aromaticum* L. extract on ruminal fermentation and degradability *in vitro*

Andrés Gilberto Limas-Martínez¹ , Edwin Rafael Alvarado-Ramírez² , Daniel López-Aguirre¹ , Sergio Ibán Mendoza-Pedroza³ , Dafne Yadira Chávez-Soto² , Marco Antonio Rivas-Jacobo^{4*} 

¹Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Ingeniería y Ciencias. Centro Universitario Victoria, CP. 87149. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

²Universidad Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Carretera Cd. Victoria - Cd. Mante km 5, CP. 87274. Ejido Santa Librada, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México.

³Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo. Carretera México - Texcoco km 36.5, CP. 56230. Ejido Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

⁴Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Carretera San Luis - Matehuala km 14.5, CP. 78321. Ejido Palma de la Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México.

*Autor de correspondencia: marco.rivas@uaslp.mx

Artículo científico

Recibido: 16 de marzo 2024

Aceptado: 05 de febrero 2025

RESUMEN. Se evaluó el efecto de dosis crecientes (0, 0.6, 1.2 y 1.8 mL g⁻¹ MS) de extracto de *Syzygium aromaticum* sobre la fermentación y degradabilidad ruminal *in vitro*, utilizando como sustrato una dieta para corderos en crecimiento. Se determinó la composición química de la dieta y los compuestos del extracto de *S. aromaticum*. Se utilizó el líquido ruminal de cuatro corderos Pelibuey en etapa de crecimiento (21 ± 0.3 kg de peso vivo) para realizar la prueba de fermentación ruminal *in vitro* (FRIV), producción de gas total (PGT) y degradabilidad ruminal *in vitro* (DRIV). La adición de dosis crecientes de extracto de *S. aromaticum* en la dieta generó un efecto cuadrático positivo ($p < 0.05$) en la fase de retraso antes de iniciar la PGT y la tasa de PGT; mientras que, en la asíntota de PGT, la PGT acumulada, la degradabilidad de la materia seca (DMS), los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la energía metabolizable (EM) el efecto cuadrático fue negativo. En una segunda prueba de degradabilidad donde solo se evaluó la dosis de 0.6 mL g⁻¹ MS, el extracto no influyó ($p > 0.05$) en la DMS a las 6, 18 y 48 h de fermentación, y aunque a las 24 h disminuyó ($p < 0.05$) 8.9%, a las 12 y 72 h incrementó ($p < 0.05$) hasta 3.0 y 5.9%, respectivamente. En conclusión, el extracto de *S. aromaticum* a una dosis de 0.6 mL g⁻¹ MS modifica favorablemente la fermentación y degradabilidad ruminal *in vitro*.

Palabras clave: clavo de olor, compuestos bioactivos, extractos vegetales, fermentación *in vitro*, cordero.

ABSTRACT. To evaluate the effect of increasing doses (0, 0.6, 1.2 and 1.8 mL g⁻¹ DM) of *Syzygium aromaticum* extract on ruminal fermentation and degradability *in vitro*, using a diet for growing lambs as a substrate. The chemical composition of the diet and the compounds of the *S. aromaticum* extract were determined. The ruminal fluid of four Pelibuey lambs in the growth stage (21 ± 0.3 kg live weight) was used to perform the *in vitro* rumen fermentation test (IVRF), total gas production (TGP) and *in vitro* rumen degradability (IVRD) test. The addition of increasing doses of *S. aromaticum* extract in the diet generated a positive quadratic effect ($p < 0.05$) in the lag phase before starting the TGP and the TGP rate, while in the TGP asymptote, accumulated TGP, dry matter degradability (DMD), short chain fatty acids (SCFA) and metabolizable energy (ME) the quadratic effect was negative. In a second degradability test where only the dose of 0.6 mL g⁻¹ DM was evaluated, the extract did not influence ($p > 0.05$) the DMS at 6, 18 and 48 h of fermentation, and although it decreased at 24 h ($p < 0.05$) 8.9%, at 12 and 72 h it increased ($p < 0.05$) to 3.0 and 5.9%, respectively. In conclusion, the *S. aromaticum* extract at a dose of 0.6 mL g⁻¹ DM favorably modifies the *in vitro* ruminal fermentation and degradability.

Keywords: cloves, bioactive compounds, plant extracts, *in vitro* fermentation, lambs.

Como citar: Limas-Martínez AG, Alvarado-Ramírez ER, López-Aguirre D, Mendoza-Pedroza SI, Chávez-Soto DY, Rivas-Jacobo MA (2025) Efecto del extracto de *Syzygium aromaticum* L. sobre la fermentación y degradabilidad ruminal *in vitro*. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 12(1): e4069. DOI: 10.19136/era.a12n1.4069.

INTRODUCCIÓN

El impacto del cambio climático en los sistemas de producción animal es un tema que está cobrando relevancia debido a los efectos adversos que ha provocado y que están dificultando el incremento en la producción de alimentos para cubrir la creciente demanda (Godde *et al.* 2021), lo que ha obligado a los productores a emprender acciones para mejorar la productividad y la rentabilidad de sus sistemas de producción. Una estrategia que se ha implementado es la utilización de aditivos alimentarios sintéticos, como los ionóforos, agonistas β -adrenérgicos, tampones (buffers) y antibióticos promotores del crecimiento, los cuales alteran favorablemente la estructura de la comunidad microbiana del rumen, redirigen la fermentación ruminal hacia rutas metabólicas más eficientes, reducen las tasas de trastornos digestivos y mitigan la emisión de gases de efecto invernadero (Marques y Cooke 2021). Sin embargo, el uso de estos aditivos ha generado preocupación pública en los últimos años por su posible contribución en la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, su transmisión del ganado a los humanos y su residualidad en los animales (Akanmu *et al.* 2020). En consecuencia, se requieren alternativas que proporcionen beneficios similares a los de estos aditivos y, sobre todo, que mejoren la utilización del alimento y la respuesta productiva de los animales.

En los últimos años, ha surgido un creciente interés en el uso de extractos derivados de las plantas como una alternativa natural a los antibióticos sintéticos, especialmente los extractos de leguminosas y especias (Zhang *et al.* 2019). Lo anterior se debe a la capacidad que han demostrado para alterar positivamente la fermentación ruminal y la digestibilidad de nutrientes, lo que contribuye a una mayor eficiencia de conversión alimenticia y productividad en los animales (Shaaban *et al.* 2021), así como a la reducción del impacto de la ganadería en el ambiente (Faniyi *et al.* 2019). Estos múltiples beneficios se han atribuido a las propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, antibióticas, antiinflamatorias, antioxidantes, antisépticas e inmunológicas que poseen estos extractos (Tomas *et al.* 2022, Mikulová *et al.* 2023). A su vez, dichas propiedades derivan de los metabolitos secundarios con actividad biológica presentes en las plantas, entre los que se incluyen flavonoides, alcaloides, taninos, saponinas y aceites esenciales (Faniyi *et al.* 2019). No obstante, el grado de efectividad de los metabolitos es variado y en parte depende de la diversidad, sinergia y su combinación, así como del componente morfológico de la planta, tiempo de cosecha, almacenamiento y método de extracción (Demirtaş *et al.* 2018).

Se ha informado que la especie *Syzygium aromaticum* L. (sin. *Eugenia caryophyllata*), comúnmente conocida como clavo de olor, contiene compuestos aromáticos que pertenecen al grupo de los fenoles como principales metabolitos secundarios con bioactividad, especialmente el eugenol (4-alil-2-metoxifenol; $C_{10}H_{12}O_2$) y sus derivados (Ulanowska y Olas 2021). Estos compuestos bioactivos se concentran principalmente en los botones florales de las plantas, los cuales se han utilizado desde hace varios siglos en la cocina para dar sabor y conservar los alimentos así como también en la elaboración de productos nutracéuticos y medicinales (Saeed *et al.* 2021). Sin embargo, se ha demostrado que también tienen el potencial para mejorar la fermentación ruminal del alimento, y modificar favorablemente la proteólisis, el pH y la producción de ácidos grasos de cadena corta en el ganado rumiante (Cardozo *et al.* 2005, Ramadan *et al.* 2022). A pesar de lo anterior, en estudios previos se ha reportado que la respuesta positiva de los extractos en la

fermentación ruminal es dependiente de la dosis (Faniyi *et al.* 2019), por lo que se requieren más estudios que permitan determinar la dosis óptima y evitar efectos adversos en los animales, como la inhibición de la fermentación y la reducción de la degradabilidad del alimento en el rumen. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de dosis crecientes de extracto de *S. aromaticum* sobre la fermentación y degradabilidad ruminal *in vitro* de una dieta para corderos en etapa de crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos experimentales y dieta

Los tratamientos consistieron en la utilización de extracto de *S. aromaticum* L. como aditivo alimentario en dosis de 0 (control), 0.6, 1.2 y 1.8 mL g⁻¹ MS, y se eligió esta especie debido a sus propiedades antimicrobianas y digestivas. Como sustrato se utilizó una dieta elaborada para cumplir con los requerimientos nutricionales de corderos en crecimiento y una ganancia diaria de peso de 200 g d⁻¹ (NRC 2007). Antes de la evaluación, se obtuvieron tres muestras (200 g) representativas de la dieta, se deshidrataron a 65 °C por 48 h en una estufa de aire forzado y se molieron en un molino (Thomas Wiley® Laboratory Mill modelo 4, Swedesboro, EE.UU.) con malla de 1 mm.

Preparación de extracto

El extracto se elaboró con los botones florales de *S. aromaticum* L., los cuales se adquirieron en un comercio local de herbolaria, y antes de su uso, se deshidrataron a 50 °C hasta peso constante y se molieron en un molino de martillos (modelo 4, marca Thomas Wiley® Laboratory Mill) con tamiz de 1 mm. La extracción se realizó siguiendo la metodología descrita por Salem (2012) y Cedillo *et al.* (2014), que consiste en preparar una solución con 10 mL de metanol (99.8/100, grado analítico, marca Fermont), 10 mL de etanol (99/100, grado analítico, marca Fermont) y 80 mL de agua destilada, y mezclarla con el material vegetal a una proporción de 1:8 (p/v). Esta mezcla se mantuvo a temperatura ambiente (25-30 °C) por 48 h en un lugar libre de radiación solar directa, y después se incubó a 39 °C por 1 h en un baño maría. Al finalizar este proceso, la mezcla se filtró a través de cuatro capas de estopilla, y el metano y el etanol se eliminaron mediante destilación a presión reducida en un evaporador rotatorio (Rotavapor® R-100, marca Büchi). El extracto resultante se almacenó a 4 °C.

Análisis químicos

La composición química de la dieta y los compuestos secundarios del extracto se analizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas. El contenido de materia seca (MS; método 930.15), materia orgánica (MO = 1000 – ceniza; método 924.05), extracto etéreo (método 920.23) y proteína cruda (PC = contenido de nitrógeno × 6.25; método 984.13) se determinaron siguiendo los métodos de la AOAC (1990). La fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina se estimaron de acuerdo con la metodología propuesta por Van-Soest *et al.* (1991), y utilizando un analizador de fibra (ANKOM²⁰⁰, marca ANKOM Technology Corp.). En el análisis de FDN, las muestras se

trataron con α -amilasa, la solución detergente neutro contenía sulfito de sodio, y los valores de FDN y FDA se expresaron sin corrección por ceniza residual.

Los compuestos secundarios que se determinaron en el extracto de *S. aromaticum* L. fueron fenoles totales y las saponinas, así como la fracción acuosa. El contenido de fenoles totales se estimó fraccionando 10 mL de cada extracto por separación en embudo con doble volumen de acetato de etileno (99.7/100, grado analítico, marca Fermont®; Salem 2012). Las saponinas se determinaron añadiendo doble volumen de n-butanol para fraccionarlas (Ahmed *et al.* 1990, Makkar *et al.* 1998), mientras que el resto de la solución se consideró como fracción acuosa, que está compuesta por lectinas, polipéptidos y almidón (Cowan 1999). Los ingredientes y los resultados de la composición química de la dieta y los compuestos secundarios del extracto se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Ingredientes y composición química de la dieta para corderos en crecimiento, y contenido de compuestos secundarios en el extracto de *Syzygium aromaticum* L.

Ingredientes (g kg ⁻¹ dieta)	Dieta	<i>S. aromaticum</i>
Grano de sorgo	170	
Grano de maíz	210	
Harina de soya	150	
Heno de pasto Buffel "H-17"	390	
Melaza de caña de azúcar	50	
Premezcla mineral ¹	30	
Composición química (g kg ⁻¹ MS)		
Materia seca (g kg ⁻¹ dieta)	908	
Materia orgánica	911	
Proteína cruda	142	
Extracto etéreo	23	
Fibra detergente neutra	352	
Fibra detergente ácida	184	
Lignina	25	
Ceniza	89	
Energía metabolizable (Mcal kg ⁻¹ MS)	2.72	
Compuestos secundarios (g L ⁻¹ de extracto)		
Fenoles totales		7.52
Saponinas		2.85
Fracción acuosa		16.44

¹: Composición mineral (g o mg kg⁻¹) = Ca (120 g), P (120 g), Na (100 g), Mg (17 g), Mn (2.0 g), Cu (0.4 g), Zn (2.0 g), I (40 mg), Se (8.0 mg) y Co (7.6 mg).

Líquido ruminal

Se utilizaron cuatro corderos Pelibuey de 3 a 4 meses de edad [21 ± 0.3 kg de peso vivo (PV)] en estabulación como donadores de líquido ruminal y, un mes antes de la evaluación, fueron desparasitados (0.2 mg kg^{-1} PV; Dectiver®, marca Lapisa®) y vacunados por vía subcutánea (1 mL animal⁻¹; Vigantol® ADE fuerte, marca Elanco™). Además, durante las dos semanas previas a la evaluación, se alimentaron con la dieta utilizada como sustrato y se les ofreció agua fresca y limpia *ad libitum*. Luego de este periodo de adaptación, se realizó la extracción del contenido ruminal mediante una sonda orogástrica por la mañana, antes de la alimentación, tal como lo describe Ramos-Morales *et al.* (2014). Al momento de la extracción, el contenido ruminal se colocó en un termo precalentado a 39 °C y se trasladó inmediatamente al laboratorio, donde se filtró con cuatro capas de gasa para obtener el líquido ruminal sin partículas sólidas, y se mantuvo a 39 °C hasta su uso.

Fermentación ruminal *in vitro*

La prueba de fermentación ruminal *in vitro* se realizó por quintuplicado en viales de vidrio con capacidad de 160 mL, y el medio nutritivo utilizado se preparó con solución buffer, macrominerales, microminerales, agente reductor y resazurina, como lo describe la metodología de Mauricio *et al.* (1999) y utilizando reactivos grado analítico. En cada vial se colocó un gramo de dieta, 80 mL de medio nutritivo, 20 mL de líquido ruminal y la dosis (0, 0.6, 1.2 y 1.8 mL g⁻¹ MS) de extracto que correspondía. Adicionalmente, se agregaron frascos sin sustrato y con líquido ruminal y medio nutritivo, con y sin dosis de extracto para la corrección de la producción de gas. Todos los viales se sellaron con gomas de butilo y arillos de aluminio, y se mantuvieron a 39 °C en baño maría durante la evaluación.

Medición de la producción de gas

La producción de gas total (PGT) se midió en libras por pulgada cuadrada (PSI, por sus siglas en inglés) a las 6, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h de fermentación, siguiendo el procedimiento descrito por Theodorou *et al.* (1994) con las modificaciones de Mauricio *et al.* (1999), y utilizando un transductor de presión con una precisión de $\pm 2\%$. Las presiones (PSI) obtenidas se convirtieron a volumen (mL) con un modelo de regresión generado para las condiciones del laboratorio, y después de cada medición se liberó el gas acumulado en cada frasco y la presión se igualó a cero para evitar una sobreestimación.

Degradabilidad ruminal *in vitro*

A las 120 h de fermentación, se destaparon los frascos y se filtró el contenido utilizando una bomba de vacío y crisoles de vidrio con discos sinterizados y porosidad de 100 a 160 μm (Crisol de Gooch, marca Pyrex™). El sustrato residual retenido en los crisoles se deshidrató a 65 °C por 24 h, y con los valores obtenidos se estimó la degradabilidad de la materia seca (DMS, g kg⁻¹ MS) mediante la siguiente fórmula:

$$DMS = \left(\frac{S_i - S_r}{S_i} \right) \times 1000$$

Donde: S_i = sustrato inicial en gramos, S_r = sustrato residual en gramos, y 1 000 = factor de conversión a gramos.

En una segunda prueba de degradabilidad se evaluaron las dosis de 0 y 0.6 mL g⁻¹ MS, y para ello se utilizó una incubadora (ANKOM Daysi^{II}, marca ANKOM Technology Corp.) equipada con cuatro recipientes que simulaban la temperatura y movimientos del rumen. La DMS se estimó a las 6, 12, 18, 24, 48 y 72 h de fermentación, mientras que la degradabilidad de FDN (DFDN) y FDA (DFDA) a las 24, 48 y 72 h. En cada recipiente se colocaron 30 bolsas filtro con porosidad de 25 µm (Filter bags F57, marca ANKOM Technology Corp.), 24 con 500 mg de la dieta y 6 vacías para la corrección de los datos, todas selladas térmicamente y enumeradas para su identificación. Además, se agregaron 1 600 mL de medio nutritivo preparado con la metodología de Mauricio *et al.* (1999) y 400 mL de líquido ruminal extraído de los cuatro corderos mencionados con anterioridad, así como la dosis del extracto. Durante la fermentación, los recipientes se mantuvieron a 39 °C con agitación rotacional constante, y en cada hora de muestreo se retiraron cuatro bolsas filtro con dieta y una bolsa vacía para la corrección por contaminación microbiana. Al retirar las bolsas, todas se lavaron con agua fría durante 30 minutos, deshidratadas a 65 °C por 72 h y analizadas para la determinación de la MS, FDN y FDA con las metodologías descritas anteriormente.

Cálculos

La asíntota de PGT, la tasa de PGT y el tiempo de retraso antes de iniciar la PGT se estimaron con el procedimiento NLIN del programa estadístico SAS versión 9.2 (SAS 2002), mediante el modelo propuesto por France *et al.* (2000):

$$y = b \times [1 - e^{-c(t-L)}]$$

Donde: y = volumen de PGT en el tiempo t ; b = asíntota de PGT (mL g⁻¹ MS); c = tasa de PGT (mL h⁻¹); L = tiempo (h) de retraso antes de iniciar la PGT.

La concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC; mmol g⁻¹ MS) y la energía metabolizable (EM; MJ kg⁻¹ MS) se calcularon de acuerdo con las fórmulas propuestas por Getachew *et al.* (2002), y Menke y Steingass (1988):

$$AGCC = (0.0222 \times PGT_{24}) - 0.00425$$

$$EM = 2.20 + (0.136 \times PGT_{24}) + (0.057 \times PC)$$

Donde: PGT_{24} = PGT (mL 200 mg⁻¹ MS) a las 24 h de incubación; PC = proteína cruda (% sobre base seca).

Análisis estadístico

Los datos de la fermentación ruminal *in vitro* se analizaron como un diseño completamente al azar y cinco repeticiones, mientras que los datos de la segunda prueba de degradabilidad ruminal *in vitro* fueron con el mismo diseño, pero con cuatro repeticiones, y en ambos casos se utilizó el procedimiento GLM de SAS versión 9.1 (SAS 2004). En la prueba de fermentación ruminal, el efecto de las dosis crecientes de extracto se evaluó utilizando contrastes y polinomios ortogonales, y los efectos lineales y cuadráticos se consideraron significativos cuando $p \leq 0.05$. Además, tanto de la prueba de fermentación ruminal como de la segunda prueba de degradabilidad se obtuvieron los errores medios y estándar de los cuadrados mínimos, y se utilizaron para la comparación de medias en la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

RESULTADOS

Fermentación ruminal *in vitro*

En el presente estudio, la adición y el incremento de la dosis de extracto de *S. aromaticum* L. afectó ($p < 0.05$) la cinética de PGT de la dieta para corderos en crecimiento, especialmente después de las 24 h de fermentación ruminal *in vitro* (Figura 1, Tabla 2). Con relación a los parámetros de la PGT, la tasa de PGT y el tiempo de retraso antes de iniciar la PGT presentaron un efecto cuadrático positivo ($p < 0.05$) con el incremento de la dosis de extracto de *S. aromaticum* L., mientras que en la asíntota de PGT el efecto cuadrático fue negativo ($p < 0.05$, Tabla 2). De manera similar, la adición de extracto de *S. aromaticum* L. en la dieta, generó variaciones significativas ($p < 0.05$) en la DMS, AGCC y EM, y al incrementar la dosis presentaron un efecto cuadrático negativo ($p < 0.05$, Tabla 3).

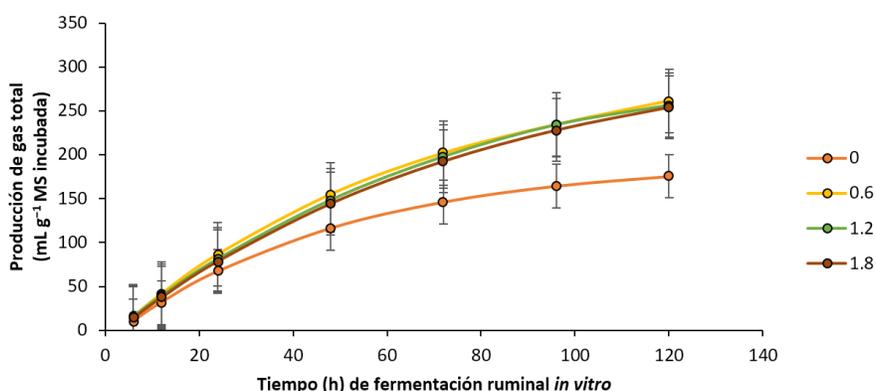


Figura 1. Cinética de la producción de gas total de una dieta para corderos en crecimiento con la adición de diferentes dosis (mL g⁻¹ MS) de extracto de *Syzygium aromaticum* L. Las barras en cada punto indican el error estándar de la media.

Tabla 2. Parámetros y producción (mL g⁻¹ MS incubada) de gas total de una dieta para corderos en crecimiento con la adición de dosis crecientes de extracto de *Syzygium aromaticum* L., a diferentes tiempos de fermentación ruminal *in vitro*.

Dosis de extracto (mL g ⁻¹ MS)	Parámetros				Producción de gas total			
	b	c	L	6 h	12 h	24 h	72 h	120 h
0.0	193.17	0.0208	3.32	10.42	31.80	67.30	146.30	175.60
0.6	337.17	0.0156	2.59	15.77	41.62	86.65	201.92	261.35
1.2	326.42	0.0128	2.55	15.45	39.05	81.22	197.98	256.58
1.8	306.30	0.0127	2.32	14.15	37.32	78.65	192.63	254.10
EEM	10.873	0.02082	0.086	0.507	1.062	2.072	4.841	6.850
	Valor p							
Dosis	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0002	0.0002	<0.0001	<0.0001
Lineal	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0032	0.0034	<0.0001	<0.0001
Cuadrático	0.0005	0.0039	0.0147	0.0018	0.0025	0.0016	0.0002	0.0002
Con vs Ext	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

b: asíntota de PGT (mL g⁻¹ MS); c: tasa de PGT (mL h⁻¹); L: tiempo (h) de retraso antes de iniciar la PGT; EEM: error estándar de la media; Con vs Ext: control (0 mL g⁻¹ MS) vs extracto (0.6, 1.2 y 1.8 mL g⁻¹ MS).

Tabla 3. Degradabilidad de la materia seca (DMS), ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y energía metabolizable (EM) de una dieta para corderos en crecimiento con la adición de dosis crecientes de extracto de *Syzygium aromaticum* L.

Dosis (mL g ⁻¹ MS)	DMS (mg g ⁻¹ MS)	AGCC (mmol g ⁻¹ MS)	EM (MJ kg ⁻¹ MS)
0.0	741.75	1.35	11.33
0.6	837.00	1.74	13.72
1.2	809.50	1.63	13.05
1.8	791.25	1.58	12.75
EEM	8.595	0.041	0.262
Valor <i>p</i>			
Dosis	<0.0001	0.0002	0.0003
Lineal	0.0084	0.0034	0.0042
Cuadrático	0.0002	0.0016	0.0019
Con <i>vs</i> Ext	<0.0001	<0.0001	<0.0001

EEM: error estándar de la media; Con *vs* Ext: control (0 mL g⁻¹ MS) *vs* extracto (0.6, 1.2 y 1.8 mL g⁻¹ MS).

Degradabilidad ruminal *in vitro*

La adición de extracto de *S. aromaticum* L. a una dosis de 0.6 mL g⁻¹ MS no afectó la DMS a las 6, 18 y 48 horas de fermentación, ya que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre la dieta que contenía extracto y el control. Sin embargo, a las 12 y 72 horas de fermentación, la adición del extracto mejoró la DMS en 3.0 y 5.9%, aunque a las 24 horas disminuyó en 8.9% (Tabla 4). En los componentes fibrosos, a las 24 horas de fermentación, la adición del extracto disminuyó ($p < 0.05$) la DFND y DFDA en 10.6 y 20.0%, mientras que a las 48 y 72 horas mejoró ($p < 0.05$) hasta en 16.8 y 11.8%, respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. Degradabilidad de la materia seca (DMS), fibra detergente neutro (DFDN) y fibra detergente ácido (DFDA) de una dieta para corderos en crecimiento con la adición de extracto de *Syzygium aromaticum* L., a diferentes tiempos de fermentación ruminal *in vitro*.

Componente	<i>S. aromaticum</i> (mL g ⁻¹ MS)		EEM	Valor <i>p</i>
	0	0.6		
DMS (mg g ⁻¹ MS)				
6 h	380.9	363.4	5.28	0.0568
12 h	440.3 ^b	453.6 ^a	2.36	0.0074
18 h	521.2	520.0	4.51	0.8572
24 h	602.8 ^a	549.2 ^b	7.17	0.0019
48 h	722.0	721.0	7.58	0.9287
72 h	731.3 ^b	774.2 ^a	7.18	0.0055
DFDN (mg g ⁻¹ FDN)				
24 h	429.9 ^a	384.5 ^b	7.99	0.0057
48 h	597.3 ^b	648.3 ^a	7.21	0.0025
72 h	680.1 ^b	760.3 ^a	9.84	0.0012
DFDA (mg g ⁻¹ FDA)				
24 h	256.3 ^a	191.7 ^b	6.92	0.0006
48 h	442.5 ^b	516.9 ^a	12.18	0.0050
72 h	561.0 ^b	590.6 ^a	11.12	0.0312

EEM: error estándar de la media. Medias con letra diferente en superíndice dentro de una misma fila indica diferencia significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

DISCUSIÓN

Fermentación ruminal *in vitro*

Los extractos de plantas que contienen metabolitos secundarios con bioactividad (MSB) pueden alterar favorable o desfavorablemente la estructura poblacional del microbiota ruminal y sus actividades fisiológicas (Hassan *et al.* 2020), lo que se refleja en la fermentación del alimento y la producción de gas total. En el estudio actual, la adición y el aumento de la dosis de extracto de *S. aromaticum* L. redujeron (22.0-31.1%) la fase de retraso, lo que es consistente con lo reportado por Hernández *et al.* (2022) quienes indicaron que la adición de extracto de fruto de *Caesalpinia coriaria* redujo la fase de retraso y se atribuye a la capacidad de los compuestos fenólicos para estimular el crecimiento de los microbios ruminales, ya que esto acelera la colonización de las partículas de alimento y acorta el tiempo de adaptación de los microbios a la dieta (Pedraza-Hernández *et al.* 2019). De esta manera, algunos microbios ruminales pueden metabolizar compuestos glucósidos y utilizarlos como fuente de energía (Goel *et al.* 2008), por lo que la reducción de la fase de retraso también puede atribuirse a las saponinas del extracto, que promovieron una rápida reactivación y aumento de la actividad de los microbios, como se ha reportado en estudios antecedentes (Ebeid *et al.* 2020, Kholif y Olafadehan 2021). Es importante señalar que, si bien la adición de extracto de *S. aromaticum* L. incrementó el tiempo de fermentación de la dieta, la tasa de producción de gas total disminuyó (25.0-39.0%) al incrementar la dosis de 0.6 a 1.8 mL g⁻¹ MS, y aunque el extracto mantuvo la producción de gas asintótica y total acumulada por encima de la producción obtenida en la dieta control, también disminuyó (1.8-9.2%) a medida que aumentó la dosis. Estos hallazgos están de acuerdo con los informados por Zhou *et al.* (2020), quienes reportaron que la producción de gas asintótica y total acumulada disminuyó al incrementar la dosis de extracto de hojas de *Origanum vulgare*, pero es contrario a lo reportado por Pedraza-Hernández *et al.* (2019) y Hernández *et al.* (2022), quienes informaron que la producción de gas asintótica y total acumulada aumentó al incrementar la dosis de extracto de hojas de *Moringa oleifera* y fruto de *Caesalpinia coriaria*, respectivamente. Estas discrepancias sugieren que la dosificación adecuada depende de la especie y el componente morfológico de la planta que se utiliza, ya que cada especie y componente tiene una mezcla de metabolitos secundarios con una estructura química y concentración variable (Bodas *et al.* 2012, Cobellis *et al.* 2016). En el caso de *S. aromaticum* L., el eugenol es el compuesto fenólico con mayor actividad antimicrobiana debido al anillo fenólico y grupo hidroxilo que posee en su estructura química (Saeed *et al.* 2021), y al igual que las saponinas, tiene la capacidad de aumentar la producción de propionato y reducir la producción de acetato y butirato, lo que está asociado con la susceptibilidad de los microbios gram positivos a la actividad antimicrobiana de estos compuestos (Hassan *et al.* 2020, Ku-Vera *et al.* 2020). Este efecto justifica la disminución de la producción de gas asintótica y total acumulada al incrementar la dosis de extracto de *S. aromaticum* en el estudio actual, ya que la producción de ácido propiónico aporta menor cantidad de gas a la producción total en comparación con la producción de los ácidos acético y butírico (Sucu 2023).

Con relación al impacto positivo que presentó la degradabilidad de la materia seca (DMS), los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y la energía metabolizable (EM) con la adición de extracto de *S. aromaticum* L., se atribuye principalmente a las saponinas debido a que tienen la capacidad de aumentar la población total de bacterias directa o indirectamente, ya sea estimulando el crecimiento y la proliferación de bacterias o reduciendo la depredación de bacterias al inhibir la

población total de protozoos, respectivamente (Calabrò 2015, Patra *et al.* 2017, Morsy *et al.* 2022). Además, los AGCC y la EM son directamente proporcionales a la cantidad de nutrientes degradados, especialmente carbohidratos (Dong *et al.* 2021, Kholif *et al.* 2021), y se sabe que los MSB, como el eugenol, pueden estimular la actividad de las bacterias ruminales involucradas en la degradación de los carbohidratos (El-Essawy *et al.* 2021, Rossi *et al.* 2022), lo que sugiere que los compuestos fenólicos también contribuyeron en el incremento de la producción total de AGCC y EM. Sin embargo, estos efectos benéficos solo se obtienen utilizando dosis apropiadas, ya que existen microbios ruminales como las bacterias fibrolíticas que son sensibles a dosis elevadas de MSB, especialmente de compuestos fenólicos, lo cual afecta negativamente la degradabilidad de los componentes fibrosos del alimento y, en consecuencia, disminuye la producción de AGCC y la EM (Kim *et al.* 2019, Kholif *et al.* 2024). En este sentido, se ha reportado que la adición de una dosis baja (0.6 mL g⁻¹ MS) de extracto de hojas de *Salix babylonica* contribuye a que los microbios ruminales descompongan eficientemente el sustrato, mientras que en dosis moderada (1.2 mL g⁻¹ MS) o alta (1.8 mL g⁻¹ MS) disminuye la degradabilidad del sustrato y la disponibilidad de energía (Salem *et al.* 2014), lo cual concuerda con lo obtenido en el presente estudio dado que con la dosis más baja (0.6 mL g⁻¹ MS) mejoró la DMS, los AGCC y la EM, mientras que con las dosis moderada (1.2 mL g⁻¹ MS) y alta (1.8 mL g⁻¹ MS) se generó una reducción en los valores, aunque continuaron siendo superiores a los del control. Además, como se mencionó anteriormente, los protozoos son afectados por las saponinas y presentan una correlación positiva con los AGCC, especialmente los protozoos ciliados, que se asocian con una mayor producción de acetato y butirato (Hassan *et al.* 2020), lo que permite suponer que en el estudio actual la producción total de AGCC también podría haber disminuido debido a una reducción en la producción de acetato y butirato.

Degradabilidad ruminal *in vitro*

En los rumiantes, la mayor parte del alimento se degrada en el rumen y, por lo tanto, la evaluación de su degradabilidad al manipular la fermentación ruminal es sustancial para determinar si los cambios son favorables o desfavorables (Zhou *et al.* 2020). En el estudio actual, durante las primeras 24 h de fermentación hubo fluctuaciones en la degradabilidad de la dieta que contenía extracto de *S. aromaticum* L., lo que es normal considerando que los microbios ruminales tienen diferentes tasas de crecimiento y requieren de un periodo de adaptación a los cambios de dieta y/o aditivos alimentarios (Righi *et al.* 2017, Elghandour *et al.* 2023). Además, es probable que el extracto suprimiera o inhibiera la colonización y digestión de los carbohidratos fácilmente fermentables, lo que reduce la actividad de las bacterias amilasa y proteasa y conduce a una menor degradabilidad del alimento (Hassan *et al.* 2020), tal como ocurrió a las 24 h. Sin embargo, transcurrido este tiempo, el extracto de *S. aromaticum* L. promovió un aumento en la DMS y los componentes fibrosos (hemicelulosa y celulosa) de la dieta, lo cual indica una elevada actividad de las bacterias fibrolíticas y concuerda con los hallazgos informados por Kim *et al.* (2019). Estos autores señalaron que la inclusión de una mezcla de MSB, con el eugenol como su componente principal, mejoró la degradabilidad ruminal de la dieta, y lo atribuyeron al aumento significativo de las bacterias *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*, ya que son las bacterias fibrolíticas más representativas del rumen (Koike *et al.* 2014). Sin embargo, aunque estas tres bacterias ruminales desempeñan un papel dominante en la digestión de los componentes fibrosos, los hongos también contribuyen a la descomposición debido a la participación del consorcio de

enzimas que producen, y su actividad amilolítica y proteolítica (Hassan *et al.* 2020), lo que permite suponer que posiblemente también los hongos participaron de manera activa en la degradación de la dieta que contenía extracto de *S. aromaticum* L. Además, como ya se indicó anteriormente, las saponinas pueden suprimir la población total de protozoos, lo que origina un aumento en la densidad y actividad de las bacterias ruminales (Goel *et al.* 2008, Calabrò 2015), lo que a su vez se asocia positivamente con una mayor degradabilidad del alimento.

CONCLUSIONES

La utilización del extracto de *Syzygium aromaticum* L. como aditivo alimentario en las dosis evaluadas alteró la fermentación ruminal *in vitro* de la dieta para corderos en crecimiento, y la dosis de 0.6 mL g⁻¹ MS presentó los mejores valores. Esta dosis aumentó la degradabilidad de la materia seca, fibra detergente neutro y fibra detergente ácido, lo que se reflejó en una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena corta y energía metabolizable, que será sin duda alguna muy beneficioso para la ganancia de peso de los corderos, por lo que se sugiere probar en este parámetro en ovinos de engorda. Aspectos que también podrán probarse en otras investigaciones en ovejas en reproducción para mejorar la tasa de ovulación por la mejor disponibilidad de energía.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas por las facilidades brindadas para llevar a cabo este trabajo, y a la Ing. Ana C. Tovar-Zurita por su ayuda en los análisis de laboratorio.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

LITERATURA CITADA

- Ahmed VU, Perveen S, Bano S (1990) Saponin from the leaves of *Guaiacum officinale*. *Phytochemistry* 29(10): 3287-3290. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(90\)80201-Q](https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)80201-Q)
- Akanmu AM, Hassen A, Adejoro FA (2020) Haematology and serum biochemical indices of lambs supplemented with *Moringa oleifera*, *Jatropha curcas* and *Aloe vera* leaf extract as anti-methanogenic additives. *Antibiotics* 9(9): 601. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090601>
- AOAC (1990) Official methods of analysis. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA. 672p.
- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S (2012) Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176(1-4): 78-93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>

- Calabrò S (2015) Plant secondary metabolites. In: Puniya A, Singh R, Kamra D (eds) Rumen microbiology: From evolution to revolution. Springer. New Delhi, India. pp. 153-159. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_11
- Cardozo PW, 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. *Journal of Animal Science* 83(11): 2572-2579. <https://doi.org/10.2527/2005.83112572x>
- Cedillo J, Vázquez-Armijo JF, González-Reyna A, Salem AZM, Kholif AE, Hernández-Meléndez J, Martínez-González JC, Montes de Oca JR, Rivero N, López D (2014) Effects of different doses of *Salix babylonica* extract on growth performance and diet *in vitro* gas production in Pelibuey growing lambs. *Italian Journal of Animal Science* 13(3): 3165. <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3165>
- Cobellis G, Trabalza-Marinucci M, Marcotullio MC, Yu Z (2016) Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 215: 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.008>
- Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564>
- Demirtaş A, Öztürk H, Pişkin I (2018) Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 65(2): 213-217.
- Dong JN, Li SZ, Chen X, Qin GX, Wang T, Sun Z, Wu D, Zhao W, Demalash N, Zhang XF, Zhen YG (2021) Effects of different combinations of sugar and starch concentrations on ruminal fermentation and bacterial-community composition *in vitro*. *Frontiers in Nutrition* 8: 727714. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.727714>
- Ebeid HM, Mengwei L, Kholif AE, Hassan FU, Lijuan P, Xin L, Chengjian Y (2020) *Moringa oleifera* oil modulates rumen microflora to mediate *in vitro* fermentation kinetics and methanogenesis in total mix rations. *Current Microbiology* 77: 1271-1282. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01935-2>
- El-Essawy AM, Anele UY, Abdel-Wahed AM, Abdou AR, Khatib IM (2021) Effects of anise, clove and thyme essential oils supplementation on rumen fermentation, blood metabolites, milk yield and milk composition in lactating goats. *Animal Feed Science and Technology* 271: 114760. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114760>
- Elghandour MMM, Acosta-Lozano N, Díaz AT, Castillo-Lopez E, Cipriano-Salazar M, Barros-Rodríguez M, Inyang UA, Purba AR, Salem AZM (2023) Influence of *Azadirachta indica* and *Cnidioscolus angustidens* aqueous extract on cattle ruminal gas production and degradability *in vitro*. *Frontiers in Veterinary Science* 10: 1090729. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1090729>
- Faniyi TO, Prates ÊR, Adegbeye MJ, Adewumi MK, Elghandour MMM, Salem AZM, Ritt L, Zubieta AS, Stella Laion, Ticiani E, Jack AA (2019) Prediction of biogas and pressure from rumen fermentation using plant extracts to enhance biodigestibility and mitigate biogases. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 27043-27051. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05585-1>
- France J, Dijkstra J, Dhanoa MS, López S, Bannink A (2000) Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro* derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition* 83: 143-150. <https://doi.org/10.1017/S0007114500000180>
- Getachew G, Makkar HPS, Becker K (2002) Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. *The Journal of Agricultural Science* 139(3): 341-352. <https://doi.org/10.1017/S0021859602002393>

- Godde CM, Mason-D'Croz D, Mayberry DE, Thornton PK, Herrero M (2021) Impacts of climate change on the livestock food supply chain; a review of the evidence. *Global Food Security* 28: 100488. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2020.100488>
- Goel G, Makkar HPS, Becker K (2008) Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology* 105(3): 770-777. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03818.x>
- Hassan FU, Arshad MA, Ebeid HM, Rehman MSU, Khan MS, Shahid S, Yang C (2020) Phytogetic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet-microbe interaction. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 575801. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801>
- Hernández RPE, Mellado M, Adegbeye MJ, Salem AZM, Ponce CJL, Elghandour MMM, Omotoso OB (2022) Effects of long-term supplementation of *Caesalpinia coriaria* fruit extract on ruminal methane, carbon monoxide, and hydrogen sulfide production in sheep. *Biomass Conversion and Biorefinery* 1-14. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03260-z>
- Kholif AE, Elazab MA, Matloup OH, Olafadehan OA, Sallam SMA (2021) Crude coriander oil in the diet of lactating goats enhanced lactational performance, ruminal fermentation, apparent nutrient digestibility, and blood chemistry. *Small Ruminant Research* 204: 106522. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106522>
- Kholif AE, Gouda GA, Fahmy M, Morsy TA, Abdelsattar MM, Vargas-Bello-Pérez E (2024) Fennel seeds dietary inclusion as a sustainable approach to reduce methane production and improve nutrient utilization and ruminal fermentation. *Animal Science Journal* 95(1): e13910. <https://doi.org/10.1111/asj.13910>
- Kholif AE, Olafadehan OA (2021) Essential oils and phytogetic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochemistry Reviews* 20(6): 1087-1108. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09739-3>
- Kim H, Jung E, Lee HG, Kim B, Cho S, Lee S, Kwon I, Seo J (2019) Essential oil mixture on rumen fermentation and microbial community-an *in vitro* study. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 32(6): 808. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0652>
- Koike S, Yabuki H, Kobayashi Y (2014) Interaction of rumen bacteria as assumed by colonization patterns on untreated and alkali-treated rice straw. *Animal Science Journal* 85(5): 524-531. <https://doi.org/10.1111/asj.12176>
- Ku-Vera JC, Jiménez-Ocampo R, Valencia-Salazar SS, Montoya-Flores MD, Molina-Botero IC, Arango J., Gómez BCA, Aguilar PCF, Solorio-Sánchez FJ (2020) Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 584. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00584>
- Makkar HPS, Sen S, Blümmel M, Becker K (1998) Effects of fractions containing saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria* and *Acacia auriculiformis* on rumen fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46 (10): 4324-4328. <https://doi.org/10.1021/jf980269q>
- Marques RDS, Cooke RF (2021) Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. *Animals* 11(10): 2871. <https://doi.org/10.3390/ani11102871>
- Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodorou MK (1999) Semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 79(4): 321-330. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00033-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4)
- Menke KH, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.
- Mikulová K, Petrič D, Komáromyová M, Batányi D, Kozłowska M, Cieslak A, Ślusarczyk S, Várady M, Váradyová Z (2023) Growth performance and ruminal fermentation in lambs with endoparasites and

- in vitro* effect of medicinal plants. *Agriculture* 13(9): 1826.
<http://dx.doi.org/10.3390/agriculture13091826>
- Morsy TA, Gouda GA, Kholif AE (2022) *In vitro* fermentation and production of methane and carbon dioxide from rations containing *Moringa oleifera* leave silage as a replacement of soybean meal: *in vitro* assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 29(46): 69743-69752.
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20622-2>
- NRC (2007) Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academy Press, Washington DC, USA. 347p.
- Patra A, Park T, Kim M, Yu Z (2017) Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8: 13.
<https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Pedraza-Hernández J, Elghandour MMM, Khusro A, Camacho-Diaz LM, Vallejo LH, Barbabosa-Pliego A, Salem AZ (2019) Mitigation of ruminal biogases production from goats using *Moringa oleifera* extract and live yeast culture for a cleaner agriculture environment. *Journal of Cleaner Production* 234: 779-786. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.06.126>
- Ramadan MF (2022) Introduction to clove: Chemistry, functionality and techno-applications. In: Ramadan MF (ed) Clove (*Syzygium aromaticum*): Chemistry, functionality and applications. Academic Press. Cambridge, USA. pp. 1-8. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85177-0.00003-3>
- Ramos-Morales E, Arco-Pérez A, Martín-García AI, Yáñez-Ruiz DR, Frutos P, Hervás G (2014) Use of stomach tubing as an alternative to rumen cannulation to study ruminal fermentation and microbiota in sheep and goats. *Animal Feed Science and Technology* 198:57-66.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.016>
- Righi F, Simoni M, Foskolos A, Beretti V, Sabbioni A, Quarantelli A (2017) *In vitro* ruminal dry matter and neutral detergent fibre digestibility of common feedstuffs as affected by the addition of essential oils and their active compounds. *Journal of Animal and Feed Science* 26(3): 204-212.
<https://doi.org/10.22358/jafs/76754/2017>
- Rossi CAS, Grossi S, Dell'Anno M, Compiani R, Rossi L (2022) Effect of a blend of essential oils, bioflavonoids and tannins on *in vitro* methane production and *in vivo* production efficiency in dairy cows. *Animals* 12(6): 728. <http://dx.doi.org/10.3390/ani12060728>
- Saeed M, Khan MS, Alagawany M, Farag MR, Alqaisi O, Aqib AI, Kuma Ramadan, Kumar MMF (2021) Clove (*Syzygium aromaticum*) and its phytochemicals in ruminant feed: An updated review. *Rendiconti lincei. Scienze Fisiche e Naturali* 32: 273-285. <https://doi.org/10.1007/s12210-021-00985-3>
- Salem AZM, Ryena AG, Elghandour MM, Camacho LM, Kholif AE, Salazar MC, Domínguez IA, Jiménez RM, Almaraz EM, Martínez AGL, Mariezcurrena MA (2014) Influence of *Salix babylonica* extract in combination or not with increasing levels of minerals mixture on *in vitro* rumen gas production kinetics of a total mixed ration. *Italian Journal of Animal Science* 13(4): 3110.
<https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3110>
- Salem AZM (2012) Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifies *in vitro* gas production of other tree leaves. *Animal Feed Science and Technology* 176(1-4): 94-101.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.011>
- SAS (2004) Institute Inc. SAS/STAT 9.1 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. 5131p.
- Shaaban MM, Kholif AE, Abd El Tawab AM, Radwan MA, Hadhoud FI, Khatlab MSA, Saleh HM, Anele UY (2021) Thyme and celery as potential alternatives to ionophores use in livestock production: Their effects on feed utilization, growth performance and meat quality of Barki lambs. *Small Ruminant Research* 200: 106400. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106400>
- Sucu E (2023) *In vitro* studies on rumen fermentation and methanogenesis of different microalgae and their effects on acidosis in dairy cows. *Fermentation* 9(3): 229. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030229>

- 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. *Animal Feed Science and Technology* 48(3-4): 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
- Tomas A, Maroyi A, Cheikhoussef N, Hussein AA, Cheikhoussef A (2022) Health-promoting activities of clove (*Syzygium aromaticum*) extracts. In: Ramadan MF (ed) *Clove (Syzygium aromaticum): Chemistry, functionality and applications*. Academic Press. Cambridge, USA. pp. 619-637. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85177-0.00018-5>
- Ulanowska M, Olas B (2021) Biological Properties and prospects for the application of eugenol-A review. *International Journal of Molecular Sciences* 22(7): 3671. <https://doi.org/10.3390/ijms22073671>
- Van-Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10): 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- Zhang J, Xu X, Cao Z, Wang Y, Yang H, Azarfar A, Li S (2019) Effect of different tannin sources on nutrient intake, digestibility, performance, nitrogen utilization, and blood parameters in dairy cows. *Animals* 9(8): 507. <https://doi.org/10.3390/ani9080507>
- Zhou R, Wu J, Lang X, Liu L, Casper DP, Wang C, Zhang L, Wei S (2020) Effects of oregano essential oil on *in vitro* ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. *Journal of Dairy Science* 103(3): 2303-2314. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16611>