ANGELO DIAS BRITO RIBEIRO

Uso de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos

Pirassununga

2015

ANGELO DIAS BRITO RIBEIRO

Uso de óleos essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3147
FMVZ

Ribeiro, Angelo Dias Brito
Uso de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos / Angelo Dias
Brito Ribeiro. -- 2015.
96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga,
2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires.

1. AGCC. 2. Fermentação ruminal. 3. Óleo essencial. 4. Ovinos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Óleo essencial de tomilho branco (thymus vulgaris) como manipulador de fermentação ruminal", protocolado sob o CEUA nº 4214031014, sob a responsabilidade de **Alexandre Vaz Pires e equipe; Angelo Dias Brito Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 25/02/2015.

We certify that the proposal "Essential oil of white thyme (thymus vulgaris) as handler of ruminal fermentation", utilizing 70 Ovines (20 males and 50 females), protocol number CEUA 4214031014, under the responsibility of **Alexandre Vaz Pires and team; Angelo Dias Brito Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 02/25/2015.

Vigência da Proposta: de 07/2013 a 06/2015

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Procedência: **Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.**

Espécie:	Ovino	Gênero:	Machos	idade:	6 meses	N:	20
Linhagem:	Santa Inês x Dorper			Peso:	50kg		

Procedência: **Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.**

Espécie:	Ovino	Gênero:	Fêmeas	idade:	4 meses	N:	50
Linhagem:	Santa Inês x Dorper			Peso:	33kg		

São Paulo, 26 de maio de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIBEIRO, Angelo Dias Brito Ribeiro

Título:

Uso de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Agradecimentos

Agradeço à Deus por me iluminar e sempre abrir novas portas na minha vida.

Aos meus pais Francisco Olinto Brito Ribeiro e Adriana Dias Ribeiro, dedico essa conquista, por sempre se esforçarem para me proporcionar as melhores condições para que meus sonhos pudessem virar realidade, pelo amor incondicional e exemplo de vida.

As minhas irmãs pela amizade e companheirismo.

A Letícia, namorada que sempre me apoiou.

Ao grande amigo e companheiro Marcos Vinícius (Bobrão), pela força nos estudos, ajuda nos experimentos.

Ao Prof. Alexandre Vaz Pires, pela confiança na condução dos experimentos e pelos ensinamentos técnicos e de vida.

A Profa. Ivanete Susin, por ceder as instalações e os animais, obrigado.

Aos funcionários do capril pela ajuda, obrigado.

Aos amigos Marcão, Vinícius, Marcelo, José Alípio, Elizângela, Renan, João Pedro (Pistórius), Gabriel (Petro), Mariana, Ana Paula, Fernanda, desejo-lhes um futuro brilhante.

Ao Daniel pela imensa ajuda estatística, meu muito obrigado.

As estagiárias Helen, Jéssica, Ana Bertoloni, Gabriela, desejo-lhes sorte.

Aos técnicos dos laboratórios César e Alan, pelo auxílio durante as análises laboratoriais.

Ao João Paulo, secretário do VNP pela prontidão em ajudar.

Aos Professores que se dedicaram em compartilhar seus conhecimentos.

À FAPESP (processo 2013/20070-3), obrigado pela bolsa de estudos.

Enfim, a todas as pessoas que direta e/ou indiretamente colaboraram para a elaboração e condução deste trabalho.

A todos, que acolham os meus mais sinceros e verdadeiros agradecimento!

Epígrafe

*“A água nunca discute com seus obstáculos, mas
os contorna”*

Augusto Cury

RESUMO

RIBEIRO, A. D. B. **Uso de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos.** [Use of essential oil of thyme (*thymus vulgaris*) in sheep diets]. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Três experimentos foram conduzidos com o objetivo de avaliar o efeito do óleo essencial de tomilho nos parâmetros ruminais, metabolismo e desempenho. O experimento I teve por objetivo avaliar se o óleo essencial de tomilho exerce efeito sobre a fermentação ruminal e consequentemente no metabolismo de ovinos confinados, bem como avaliar o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em dietas com 90% concentrado e 10% de volumoso. Foram utilizados 20 ovinos $\frac{1}{2}$ Dorper x $\frac{1}{2}$ Santa Inês, machos castrados e canulados no rúmen. O experimento teve duração de 23 dias, dos quais 18 foram para adaptação as dietas. A ração base foi composta por feno de “coastcross”, milho moído, farelo de soja, calcário calcítico, cloreto de amônia e mistura mineral. As dietas experimentais foram: 1) ração base + 25 mg de monensina por kg/MS, 2) ração base + 1,25 mL, 3) ração base + 2,50 mL e 4) 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS. O consumo de MS, MO, FDN e PB foram similares entre os tratamentos. Apresentando o mesmo comportamento para as variáveis de digestibilidade da MS, MO, FDN e PB. As concentrações de AGCC para as dietas com óleo essencial foram semelhantes à dieta com monensina. A inclusão de óleo essencial de tomilho nas dietas indica que este é uma potencial alternativa à monensina. O objetivo do experimento II foi avaliar se o óleo essencial de tomilho exerce efeito sobre a fermentação ruminal e consequentemente no metabolismo de ovinos confinados, bem como avaliar o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes em dietas com 80% volumoso e 20% concentrado. Foram utilizados 20 ovinos $\frac{1}{2}$ Dorper x $\frac{1}{2}$ Santa Inês, machos castrados e canulados no rúmen. O experimento teve duração de 28 dias, dos quais 23 foram para adaptação as dietas experimentais. A dieta base foi composta por pré – secado de “tifton”, milho moído, farelo de soja, calcário calcítico e mistura mineral. As dietas experimentais foram: 1) ração base + 25 mg de monensina por kg/MS, 2) ração base + 1,25 mL, 3) ração base + 2,50 mL e 4) 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS. As dietas experimentais com óleos essencial apresentaram valores de consumo e digestibilidade da MS, MO, FDN e PB similares à dieta com monensina. A menor

inclusão do óleo essencial apresentou valor de propionato e relação acetato:propionato similares à monensina. Houve interação dieta x dia de colheita para isobutirato, butirato, isovalerato e total de AGCC. A dieta com 1,25 mL de óleo apresentou o maior valor de pH. O óleo essencial de tomilho pode ser uma alternativa em substituição ao uso da Monensina. O objetivo do experimento III foi avaliar o óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) sobre o ganho de peso e eficiência alimentar de borregas confinadas com dietas com alta inclusão de volumoso. Cinquenta borregas ½ Dorper x ½ Santa Inês, foram alojadas individualmente em baias cobertas. O período experimental foi de 84 dias, divididos em três sub-períodos de 28 dias. A dieta base foi composta por pré-secado de “tifton”, milho moído, farelo de soja, calcário calcítico, mistura mineral. As dietas experimentais foram: 1) ração base (sem adição de óleo essencial ou monensina); 2) ração base + 25 mg de monensina por kg/MS; 3) ração base + 1,25 mL; 4) ração base + 2,5 mL; 5) ração base + 3,75 mL de óleo essencial por kg/MS. Não houve diferença de GMD entre os tratamentos no período total. O segundo período apresentou o melhor desempenho dos animais. A infestação por coccidiose foi menor na dieta com Monensina. Os teores dos aditivos utilizados não apresentam melhora no desempenho de borregas alimentadas com alto teor de volumoso. No entanto, monensina foi capaz de controlar a coccidiose.

Palavras-chave: AGCC. Manipulação ruminal. Ovinos. Óleo essencial.

ABSTRACT

RIBEIRO, A. D. B. **Use of essential oil of thyme (*thymus vulgaris*) in sheep diets.** [Uso de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) na dieta de ovinos]. 2015. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Three experiments were conducted with the objective of evaluate the effect of thyme essential oil on ruminal fermentation, metabolism and performance. The experiment I was conducted to evaluate the thyme essential oil has an effect on ruminal fermentation and consequently the metabolism of feedlot sheep, as well as evaluate the intake and apparent digestibility of nutrients diets with 90% concentrate and 10% forage. They were used 20 sheep ½ Dorper x ½ Santa Inês, castrated males and fistulated in the rumen. The experiment lasted 23 days, of which 18 were for adaptation diets. The basal ration consisted of hay coast cross, ground corn, soybean meal, limestone, of ammonia chloride and mineral mixture. The experimental diets were: 1) basal ration + 25 mg of monensin per kg/DM, 2) basal ration + 1.25 mL, 3) basal ration + 2.50 mL and 4) basal ration + 3.75 mL of essential oil of thyme per kg/DM. The intake and digestibility of DM, OM, NDF and CP were similar between treatments. The SCFA concentrations for diets with essential oil were similar to the diet with monensina. The inclusion of thyme essential oil in diets that this is a potential alternative to monensina. The experiment II was conducted to evaluate the thyme essential oil has an effect on ruminal fermentation and consequently the metabolism of feedlot sheep, as well as evaluate the intake and apparent digestibility of nutrients diets with 80 % forage and 20% concentrate. They were used 20 sheep ½ Dorper x ½ Santa Inês, castrated males and fistulated in the rumen. The experiment lasted 28 days, of which 23 were for adaptation diets. The basal ration consisted of pre-dryng Tifton, ground corn, soybean meal, limestone and mineral mixture. The experimental diets were: 1) basal ration + 25 mg of monensin per kg/DM, 2) basal ration + 1.25 mL, 3) basal ration + 2.50 mL and 4) basal ration + 3.75 mL of essential oil of thyme per kg/DM. The intake and digestibility of DM, OM, NDF and CP were similar between treatments. The lower inclusion of essential oil showed a value propionate and acetate: propionate ratio similar monensin. There were diet x day interaction for isobutyrate, butyrate, isovalerate and the total SCFA. The diet with 1.25 mL of thyme showed the highest pH value. The thyme essential oil can be an alternative to replace the use of monensina.

The experiment III was conducted to evaluate the thyme essential oil on weight gain and feed efficiency of feedlot lambs diets with 80% forage and 20% concentrate. Fifty lambs $\frac{1}{2}$ Dorper x $\frac{1}{2}$ Santa Inês were housed individually in covered bays. The experiment lasted 84 days, divided into three sub-periods of 28 days. The basal ration consisted of pre-drying Tifton, ground corn, soybean meal, limestone and mineral mixture. The experimental diets were: 1) basal ration + 25 mg of monensin per kg/DM, 2) basal ration + 1.25 mL, 3) basal ration + 2.50 mL and 4) basal ration + 3.75 mL of essential oil of thyme per kg/DM. There was no gain difference in average daily gain between treatments in the total period. The second period had the best performance of the animals. Infestation by coccidiosis was lower in the diet with monensina. The levels of the additives used not showed improvement in performance lambs fed with high content of forage. However, monensin was able to control coccidiosis.

Keywords: SCFA. Essential oil. Sheep. Rumen manipulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mistura do óleo essencial na dieta	44
Figura 2 - Colheita de conteúdo ruminal e aferição de pH	45
Figura 3 - Animais nas instalações experimentais	61
Figura 4 - Pesagem da dieta experimental.....	64
Figura 5 - Colheita de fezes e urina	66
Figura 6 - Proporção molar de isobutirato em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou óleo essencial de tomilho	74
Figura 7 - Proporção molar de isovalerato em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou óleo essencial de tomilho	75
Figura 8 - Proporção molar de butirato em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica e óleo essencial de tomilho	76
Figura 9 - Concentração total de AGCC em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica e óleo essencial de tomilho	78
Figura 10 - Vista das baias experimentais	86
Figura 11 - Manejo alimentar.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de tomilho	42
Tabela 2 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, %MS e %MN	43
Tabela 3 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes pelos ovinos alimentados com as dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	50
Tabela 4 - Proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal e pH ruminal dos ovinos alimentados com dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	53
Tabela 5 - Efeitos dos dias de coleta durante o experimento sobre a proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal e pH ruminal dos ovinos alimentados com dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	54
Tabela 6 - Consumo e balanço de nitrogênio nos ovinos alimentados com dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	55
Tabela 7 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, %MS e %MN	63
Tabela 8 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes pelos ovinos alimentados com as dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	69
Tabela 9 - Proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal e pH ruminal dos ovinos alimentados com dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	72
Tabela 10 - Consumo e balanço de nitrogênio nos ovinos alimentados com dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	79
Tabela 11 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % MS e % MN	87
Tabela 12 - Peso corporal e desempenho dos cordeiros alimentados com dietas monensina sódica ou óleo essencial de tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	ÓLEOS ESSENCIAIS	19
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS NA FERMENTAÇÃO RUMINAL	20
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E O PH DO RÚMEN	24
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS E DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES	26
2.5	DESEMPENHO ANIMAL	28
	REFERÊNCIAS	31
3	EXPERIMENTO I: TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (<i>Thymus vulgaris</i>) COMO MANIPULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL DE OVINOS EM DIETAS COM ALTO DE CONCENTRADO.	39
3.1	INTRODUÇÃO	39
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.2.1	Local do Experimento	40
3.2.2	Animais e instalações experimentais	40
3.2.3	Período experimental e delineamento	41
3.2.4	Tratamentos experimentais	41
3.2.5	Manejo alimentar	44
3.2.6	Colheita de amostras de conteúdo ruminal para análise de N- amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	45
3.2.7	Colheita de sobras, amostras de fezes e urina	45
3.2.8	Análises laboratoriais e cálculos	46
3.2.7.1	Ração oferta, sobras e fezes	46
3.2.7.2	AGCC e N-amoniacal	47
3.2.7.3	Análise estatística	47
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.4	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	56
4	EXPERIMENTO II: TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (<i>Thymus vulgaris</i>) COMO MANIPULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM DIETAS COM ALTO TEOR DE VOLUMOSO.	59
4.1	INTRODUÇÃO	59
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	60
4.2.1	Local do experimento	60

4.2.2	Animais e instalações experimentais.....	61
4.2.3	Período experimental e delineamento	61
4.2.4	Tratamentos experimentais	62
4.2.5	Manejo alimentar	63
4.2.6	Colheita de amostras de conteúdo ruminal para análise de N- amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)	64
4.2.7	Colheita de sobras, amostras de fezes e urina.....	65
4.2.8	Análises laboratoriais e cálculos.....	66
4.2.8.1	Ração oferta, sobras, fezes e urina	66
4.2.8.2	AGCC e N – Amoniacal	66
4.2.8.3	Análise estatística	67
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.4	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS.....	81
5	EXPERIMENTO III: TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (<i>Thymus vulgaris</i>) NO DESEMPENHO DE BORREGAS ½ DORPER X ½ SANTA INÊS ALIMENTADAS COM DIETAS DE ALTO TEOR DE VOLUMOSO.	84
5.1	INTRODUÇÃO	84
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	85
5.2.1	Local do experimento	85
5.2.2	Animais e instalações experimentais.....	85
5.2.3	Delineamento experimental	86
5.2.4	Tratamentos experimentais	86
5.2.5	Manejo alimentar e pesagem	88
5.2.6	Análise estatística.....	89
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
5.4	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

Na tentativa de manipular a fermentação ruminal, visando otimizar as reações de fermentação dos constituintes da dieta, principalmente de carboidratos e proteína, pode-se utilizar da inclusão de enzimas, ionóforos, leveduras, lipídeos, tamponantes e extratos de plantas nas dietas. Um dos principais objetivos das pesquisas com extratos de plantas (óleos essenciais) é a identificação de substâncias com a capacidade de mimetizar os efeitos dos ionóforos na fermentação ruminal, principalmente na redução da relação acetato:propionato.

Os ionóforos (ex.: monensina sódica) são os aditivos alimentares mais utilizados na manipulação da fermentação ruminal (RUSSEL; STROBEL, 1989). Devido às questões de saúde pública, em 2006, a União Européia banuiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento (OJEU, 2003), sendo os ionóforos uma das classes proibidas. A partir de então, intensificou-se a busca por substâncias com propriedades antimicrobianas que pudessem substituir os ionóforos. Neste sentido, pesquisadores têm explorado as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários dos vegetais (CALSAMIGLIA et al., 2007; ARAUJO, 2010). Atividades antimicrobianas, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004). O eugenol (presente no cravo-da-índia; OUATTARA et al., 1997; SMITH-PALMER et al., 1998), o timol (presente no tomilho e orégano; JUVEN et al., 1994; MAHMOUD, 1994; OUATTARA et al., 1997), o carvacrol (presente no tomilho e orégano; SIVROPOULOU et al., 1996; DORMAN; DEANS, 2000), o cinamaldeído (presente na canela; MAHMOUD, 1994; OUATTARA et al., 1997; SMITH-PALMER et al., 1998) e a capsaicina (presente nas pimentas; DEANS; RITCHIE, 1987) são exemplos de óleos essenciais cujas propriedades antimicrobianas já foram investigadas no ambiente ruminal.

O uso de compostos secundários dos vegetais como aditivos alimentares tem como principal vantagem o baixo risco de aparecimento de resistência microbiana, já que estes compostos apresentam na maioria das vezes diversos princípios ativos, conferindo diferentes modos de ação (ACAMOVIC; BROOKER, 2005).

A interação óleo essencial/membrana celular altera a estrutura das mesmas, incluindo transporte de elétrons, gradiente de íons, translocação de proteínas,

fosforilação e outras reações dependente de enzimas, tornando-as mais fluidas e permeáveis (KNOBLOCH et al., 1986; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995; ULTEE et al., 1999; DORMAN E DEANS, 2000), o que permite o extravasamento de íons e outros conteúdos citoplasmáticos (LAMBERT et al., 2001; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

A estrutura química é a responsável pelo modo de ação e atividade antimicrobiana de cada óleo essencial (DORMAN; DEANS, 2000). A presença do grupo hidroxila (-OH) nos compostos fenólicos é fundamental para a existência da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ULTEE; BENNINK; MOEZELLAR, 2002). No entanto, a posição da hidroxila no anel fenólico parece ser menos importante, já que o timol e o carvacrol apresentam atividades semelhantes frente a variadas bactérias (ULTEE; BENNINK; MOEZELLAR, 2002). Contudo, já foram constatadas diferenças na ação do timol e carvacrol contra espécies gram-positivas e gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000).

Óleos essenciais derivados de plantas podem ser um meio para melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes, visando um melhor desempenho em animais ruminantes. Como um dos objetivos dos microbiologistas e nutricionistas de ruminantes é manipular o ecossistema microbiano ruminal, visando melhorar a conversão alimentar dos animais, em produtos de origem animal que são consumidos por humanos (BUSQUET et al., 2005a). Grande parte dos estudos sobre a utilização de óleos essenciais de plantas, até o momento, foram realizados *in vitro*, indicando que seus princípios ativos podem favorecer a fermentação ruminal (CHAVES et al., 2008; KHAN, 2010; ARAUJO, 2010).

A avaliação *in vitro* de óleos essenciais demonstrou claramente o efeito antimicrobiano destas substâncias (ARAUJO, 2010). Dentre os efeitos observados por este autor, vale ressaltar o aumento na concentração de propionato, diminuição na relação acetato:propionato e na produção de CH₄ em resposta à incubação dos óleos essenciais de aroeira folha e arnica. É amplamente conhecido o conceito de que a produção de CH₄ gera perdas energéticas ao animal, variando entre 2 e 12% da energia bruta total consumida (VAN SOEST, 1994). Sabe-se, também, que os ganhos energéticos para o animal hospedeiro (o ruminante) são maiores quando a produção de propionato aumenta em detrimento a produção de acetato. Desta forma, o fornecimento dos óleos essenciais pode resultar em aumento no ganho de peso e/ou na eficiência alimentar de ovinos em crescimento.

Tekippe et al., (2013), não encontraram nenhum ou apenas efeito marginais na produção e composição de leite de vacas holandesas. Aumento nas concentrações de AGCC ramificados, sem efeitos consistentes sobre a fermentação ruminal. E aumento da digestibilidade total da FDN, quando suplementadas com óleos essenciais.

Alguns autores observaram resultados promissores com uso de óleos essenciais para bovinos. O fornecimento do produto comercial Crina Ruminants® para novilhos resultou em eficiência alimentar (0,153) superior em comparação ao tratamento controle (0,145), sendo que a EA dos animais que receberam o óleo foi semelhante à dos animais que receberam monensina sódica (0,156) (MEYER et al., 2009).

Resultados positivos com cordeiros confinados também foram obtidos, quando se utilizou óleo de zimbro (*Juniperus communis*), cinamaldeído e um tratamento controle. Observou-se, em um GMD de 254, 250 e 217 g, para óleo de zimbro, cinamaldeído e controle, respectivamente (CHAVES et al., 2008).

Como alguns trabalhos demonstraram que os óleos essenciais possuem a capacidade de manipular a fermentação ruminal e o tomilho ou seus compostos possuem atividades antimicrobianas, inclusive redução na deaminação. Isso justifica a realização de novos experimentos para confirmarem esses efeitos e buscar as melhores doses e formas de fornecimento.

Com isso, os objetivos foram, avaliar se o tomilho exerce efeito na fermentação ruminal e conseqüentemente no metabolismo, consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes, balanço de nitrogênio no conteúdo ruminal e ganho de peso e eficiência alimentar de ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis obtidas dos mais variados órgãos vegetais, em geral via extração a vapor ou por solventes. Não são propriamente “essenciais”, e recebem tal nome devido ao cheiro prazeroso que possuem (CALSAMIGLIA et al., 2007).

São encontrados mais facilmente nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae, entre outras (POSER; MENTZ, 2004; SANTOS, 2004). Uma característica marcante que os difere das substâncias lipídicas é a volatilidade e variação de sua composição entre as diferentes partes da mesma planta (DORMAN; DEANS, 2000). A variação de sua composição química pode ser influenciada pelo ambiente no qual o vegetal se desenvolve e tipo de cultivo (WILLIAMS et al., 1998).

Os compostos mais importantes dos óleos essenciais são incluídos em dois grupos químicos: terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides. Estes dois grupos são originários de diferentes precursores do metabolismo primário e são sintetizados através de vias metabólicas diferentes (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Biologicamente, nos vegetais, os óleos essenciais atuam na defesa contra herbívoros, insetos, microrganismos, outras plantas que competem por nutrientes e luz, bem como contra o efeito prejudicial da luz ultra violeta (UV). Além de outras funções, como atrativos para aves e insetos promoverem a polinização, diferenciação da cor, com a finalidade de camuflagem e sinais para promover a colonização por microrganismos simbióticos. Eles também podem ter um possível papel nutricional durante a germinação de sementes, particularmente os que contêm nitrogênio (SAITO; SCRAMIN, 2000; RALPHS et al., 2004).

Produtos patenteados já existem no mercado, como o Biostar® (Phytosynthèse, França) à base de alcachofra (*Cynara cardunculus* subesp. *Scolymus*), ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus*) e feno-grego (*Trigonella foenum graceum*); o Crina® Ruminants (DSM Nutritional Products Ltd., Suíça), à base dos óleos essenciais timol, limoneno e guaiacol; e o Vertan® (IDENA, França), à base de timol, eugenol, vanilina e limoneno (ARAUJO, 2010).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS NA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Há cerca de 50 anos, Crane, Nelson e Brown (1957) foram provavelmente os primeiros a demonstrar os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, verificando que o limoneno e pineno eram capazes de inibir a formação de CH_4 . Oito anos depois, foi constatado que o timol inibia a deaminação ruminal, fato observado pelo acúmulo de aminoácidos juntamente com a redução na concentração de N-AMONIACAL (BORCHERS, 1965).

Alguns óleos essenciais possuem capacidade, à semelhança dos ionóforos, de atuar seletivamente sobre as populações microbianas do rúmen (CALSAMIGLIA et al., 2007), alterando o padrão fermentativo, reduzindo a relação acetato: propionato ($\text{C}_2:\text{C}_3$) e a produção de metano, o que torna o rúmen energeticamente mais eficiente. O conceito de que a produção de metano (CH_4) gera perdas energéticas ao animal, variando entre 2 e 12% da energia bruta total consumida é amplamente conhecido (VAN SOEST, 1994). Em contrapartida, a produção de CH_4 pelas *Archaea* é vital ao equilíbrio ruminal. As vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H^+ , além de não produzi-lo como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato (VAN SOEST, 1994). Caso haja acúmulo de H^+ , há alta inibição dos sistemas enzimáticos microbianos (RUSSELL, 2002).

Atividades antimicrobianas, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004). O eugenol (presente no cravo-da-índia; OUATTARA et al., 1997; SMITH-PALMER et al., 1998), o timol (presente no tomilho e orégano; JUVEN et al., 1994; MAHMOUD, 1994; OUATTARA et al., 1997), o carvacrol (presente no tomilho e orégano; SIVROPOULOU et al., 1996; DORMAN; DEANS, 2000), o cinamaldeído (presente na canela; MAHMOUD, 1994; OUATTARA et al., 1997; SMITH-PALMER et al., 1998) e a capsaicina (presente nas pimentas; DEANS; RITCHIE, 1987) são exemplos de óleos essenciais cujas propriedades antimicrobianas já foram investigadas no ambiente ruminal.

Em estudo realizado por Patra e Yu (2015) foi demonstrado, pela primeira vez, usando análise de micrarray que óleos essenciais pode afetar a dinâmica populacional

de um numero de bactérias, especialmente aquelas das famílias *Prevotellaceae*, *Butyrivibrio*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, de uma forma dependente do tipo de óleo essencial. Muita unidade taxonômica operacional bacteriana foram encontradas associadas com mudanças na digestibilidade e característica de fermentação ruminal, o que pode explicar a modulação da fermentação ruminal, devido ao aditivo na alimentação.

Uma das limitações da utilização dos óleos essenciais é a viabilidade prática de se fornecer aos animais as doses determinadas *in vitro*. Muitos óleos apresentam cheiro e gosto acentuados, o que pode dificultar a aceitação pelo animal. Muitas vezes, as doses necessárias *in vivo* podem causar efeito negativo sobre o consumo animal, não incomum serem até mesmo impraticáveis (VILLALBA; PROVENZA, 2010).

Mesmo assim, tudo leva a crer que as doses determinadas *in vitro* são superiores às necessárias *in vivo*. A concentração de bactérias é muito menor *in vitro* do que em condições naturais. A ação de um composto é função de sua capacidade de interagir com as bactérias. Logo, quanto menor a população de microrganismos, maior a dose necessária para a existência de efeito (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Por outro lado, é certo que a degradação dos compostos no rúmen, a adaptação microbiana, a taxa de passagem para o duodeno, a volatilização e absorção pela parede ruminal são responsáveis por parcela considerável das divergências entre ensaios *in vitro* e *in vivo* (VILLALBA; PROVENZA, 2010).

Além das questões nutricionais, pesquisadores se interessam pelos efeitos dos compostos secundários de plantas sobre a população de microrganismos produtores de lactato, visando selecionar plantas que contenham substâncias capazes de auxiliar no combate à acidose ruminal (HUTTON et al., 2009).

Óleos essenciais são capazes de manipular a fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008; ARAUJO, 2010) e geram alterações nas populações microbianas do rúmen, como confirmado em experimento de biologia molecular (FERME et al., 2004). Trabalho de triagem, como o de Araújo (2010) demonstrou que alguns óleos essenciais foram efetivos em alterar a fermentação ruminal *in vitro*. Estudos *in vitro* mostram, em sua maioria, redução ou ausência de efeito dos óleos essenciais sobre a concentração total de AGCC. Da mesma forma, são claros os efeitos dose-dependentes, já que elevadas inclusões

normalmente inibem a fermentação ruminal *in vitro* evidenciada pela queda na concentração de AGCC (ARAÚJO, 2010).

Assim, foi observado sua eficácia em manipular a fermentação ruminal, em que a dose de 1,5 mg/L de uma mistura de óleos essenciais foi capaz de aumentar a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em sistema *in vitro*, no entanto sem efeito na digestibilidade da matéria orgânica (CASTILLEJOS et al., 2005).

Em estudo com búfalos do pântano, Thao et al. (2014) testaram os efeitos do óleo essencial de eucalipto e concluíram que este poderia ser usado para manipular a fermentação ruminal em búfalos do pântano, como um potencial aditivo para melhorar a fermentação ruminal, mitigação da produção de metano sem efeitos negativos sobre o consumo de ração e digestibilidade dos nutrientes.

Fadiño et al. (2008), trabalhando com bovinos de corte, verificaram que o óleo de anis apresentou efeitos sobre a concentração de AGCC semelhantes à monensina e que os óleos de zimbro e cinamaldeído provocaram aumento numérico na concentração de propionato (C₃) e redução numérica na relação C₂:C₃ (CHAVES et al., 2008).

Em estudo *in vitro*, a adição de 20 µg/mL de alicina reduziu a produção de CH₄ sem efeitos sobre o padrão de AGCC e concentração de N-AMONIACAL (McALLISTER; NEWBOLD, 2008).

O conhecimento dos efeitos dos óleos essenciais sobre a metanogênese é muito carente em experimentos *in vivo*. Os resultados existentes são bastante variados, com alguns trabalhos mostrando resultados promissores. Mohammed et al. (2004) testando óleo encapsulado de raiz-forte (20 g/kg de MS consumida) apresentou 19% de redução de CH₄ em novilhos, sem efeitos sobre a população de protozoários ou a digestibilidade ruminal. Efeitos mais prolongados foram observados por Wang et al. (2009), em que 250 mg/d de mistura de óleos de orégano em ovinos reduziram em 12% o CH₄ produzido por 15 dias. Da mesma forma, 2 g/kg de MS consumida de di-alil-di-sulfeto reduziu em 11% a emissão de CH₄ em ovinos, com efeitos que perduraram por 23 dias (KLEVENHUSEN et al., 2010). Já Sallam et al. (2009) observaram que 10 mL de óleo de eucalipto reduziu em 31% a emissão de CH₄ por ovinos.

Em um estudo *in vitro* com Timol (400 mg/dL), um composto secundário presente no orégano e tomilho (*Origanum vulgare* e *Thymus vulgare*), reduziu a concentração de C₂ e C₃ e aumentou a relação C₂:C₃ (EVANS; MARTIN, 2000).

Cardozo et al. (2004), trabalhando com óleo essencial de pimenta não encontraram efeito na concentração individual dos AGCC, tendo redução somente para a proporção de valerato ($P < 0,05$). No entanto, é de salientar que, durante e o período de adaptação (oito dias), foi observado que os óleos essenciais de cinamaldeído, alho, anis e orégano reduziram acetato e aumentaram propionato entre os dias dois e seis de fermentação, não havendo diferença após o dia seis. Estes resultados corroboram com os encontrados por Evans e Martin (2000), que estes aditivos possuem efeito de curto prazo na fermentação microbiana ruminal e que a adaptação do ecossistema ruminal ocorreu após seis dias (CARDOZO et al., 2004).

A inclusão de 750 mg/dia de óleos essenciais nas bases de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno teve como tendência aumentar a produção total de AGCC no rúmen compara silagem de alfafa, o que não foi observado quando esta foi substituída pela silagem de milho (BENCHAAAR et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008).

Em estudo *in vitro*, realizado por Evans e Martin (2000), o timol foi um potente inibidor da produção de L-lactato por JB1 *S. bovis* e HD4 *S. ruminantium*. Além disso, a absorção de glicose pelas bactérias foi inibida pelo timol. Quando a fermentação da glicose pelos microrganismos mistos do rúmen foi examinada, 400 mg/mL de timol mostrou ser um forte inibidor da produção de lactato e CH_4 . No entanto, o tratamento com timol também inibiu acetato e propionato, e estas alterações nos produtos finais de fermentação não seriam nutricionalmente benéficas para o animal hospedeiro.

É comum que estudos *in vitro* demonstrem o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, com redução na degradação dos nutrientes e na concentração de AGCC. À primeira vista, observar inibição de fermentação é, sem dúvida, nutricionalmente indesejável. Contudo, o desafio está justamente em encontrar doses capazes de manipular positivamente a fermentação ruminal com pouco ou nenhum efeito inibitório sobre a fermentação total. No mais, pesquisas *in vitro* sempre apresentam limitações. É importante destacar que, mesmo para a monensina, é comum observar reduções na degradação *in vitro* da matéria orgânica (MO) e na concentração total de AGCC em função da dose utilizada (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; RUSSELL; STROBEL, 1989).

A ausência de efeitos sobre a concentração total de AGCC pode ser vista de forma positiva, desde que acompanhada por alterações na proporção molar dos AGCC, menor relação acetato:propionato ($\text{C}_2:\text{C}_3$) ou por decréscimos na produção de CH_4 e na concentração de amônia (N-AMONIAL). Vários estudos demonstraram

que óleos essenciais podem apresentar efeitos semelhantes aos ionóforos. Bons exemplos são o uso *in vitro* ou *in vivo* de ciclodextrinas de raiz-forte (MOHAMMED et al., 2004), cinamaldeído ou óleo de alho em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a) e salicilato de benzila ou óleo de alho sistema *in vitro* (BUSQUET et al., 2006).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E O pH DO RÚMEN

O rúmen é um ambiente relativamente bem tamponado, mas o pH pode variar de aproximadamente 7,0 a valores menores que 5,0, dependendo do tipo de dieta e tempo após a ingestão do alimento. Altas proporções de carboidratos não-fibrosos na dieta geralmente resulta em queda do pH. Os efeitos do pH não estão totalmente elucidados, mas incluem efeitos sobre o processo de aderência à fibra e, principalmente, sobre o metabolismo bacteriano (KOZLOSKI, 2011).

Os efeitos dos óleos essenciais podem ser modulados pelo pH, do meio, sendo que, em dietas com alto teor de concentrado com tendências ao abaixamento do pH ruminal há potencialização sobre o efeito dos óleos essenciais. Isto se deve ao fato dos óleos essenciais terem a necessidade de estar sob a forma não dissociada para interagir com os lipídeos da membrana celular (CALSAMIGLIA et al., 2007).

O óleo de canela e seu principal componente (cinamaldeído), quando incubado em meio de cultura com pH 7,0, foram eficientes em aumentar a relação $C_2 : C_3$. No entanto, em meio de cultura com pH 5,5 observou-se redução na relação $C_2 : C_3$ (CARDOZO et al., 2005).

O pH ruminal é uma das mais importantes variáveis na fermentação ruminal. Quando este é reduzido abaixo de 6,0, a digestão da fibra e o consumo são também diminuídos (MOULD et al., 1983; BRITTON; STOCK, 1987).

Russel e Dombrowski (1980) mostram que o pH é altamente correlacionado com a concentração de AGCC os quais são os principais produtos finais da fermentação e os mais importantes no metabolismo energético em ruminantes. Targer e Krause (2011) trabalharam com três compostos (cinamaldeído, eugenol e capsicum) e não encontraram efeito sobre o pH ruminal (média 5,72) e produção total de AGCC (média 129,1 mmol/L).

Novamente, a adição de óleo de canela não teve efeito no pH ruminal, na concentração total de AGCC e na proporção molar de C_2 ($P = 0,75$). Houve tendência de interação para dia de amostragem e tratamento na proporção molar de C_3 . Houve aumento ($P = 0,02$) na proporção molar de butirato, sem efeito para isobutirato, valerato e isovalerato (FRASER et al., 2007).

Newbold et al. (2004), testando três doses de cinamaldeído, não observaram alteração nos valores de pH ruminal (média 6,2) e na relação de $C_2 : C_3$. Porém, houve tendência em aumentar a concentração de AGCC total de 85 para 106 mmol/L.

Anassori et al. (2011) realizou três experimentos para avaliar o efeito da suplementação do óleo de alho e da monensina em ovinos machos. Os tratamentos foram os seguintes: dieta controle (sem aditivos), dieta controle com alho (75 g/kg MS), dieta controle com óleo de alho (500 mg/kg MS) e dieta controle com monensina (33 mg/kg MS) experimento 1. O experimento 2, as dietas foram similares às do experimento 1, com a diferença de inclusão de alho e óleo de alho nas doses de 100 g/kg da MS e 750 mg/kg da MS. No experimento 3, quatro borregos receberam a dieta controle com alho nas doses de 75 g/kg da MS e 100 g/kg da MS e óleo de alho nas doses de 500 mg/kg da MS e 750 mg/kg da MS.

Os autores não encontraram alterações nos valores de pH ruminal (com média de 6,43; 6,28 e 6,68 para os três experimentos, 1, 2 e 3 respectivamente). Para concentração de AGCC total com média de 97,04, 95,18, 96,02 mMol/L, respectivamente. Os autores concluíram que o óleo de alho em geral reduz a concentração de C_2 e aumenta a concentração de C_3 , causando, assim, redução na relação $C_2:C_3$.

Em outro estudo com dietas contendo alto teor de amido para borregos, foi observado uma redução marcante nos valores de pH ruminal e aumento na concentração total de AGCC quando carvacrol ou cinamaldeído foram incluídos na dieta ofertada aos mesmos (CHAVES et al., 2008).

Aumento na concentração de C_3 foi observada; porém não observaram alterações na relação $C_2 : C_3$ e no pH ruminal quando avaliaram a inclusão de óleo essencial de orégano em ovelhas (WANG et al., 2009).

Para ovelhas em lactação, alimentadas com doses de timol, eugenol, guaiacol, limoneno e vanilina da ordem de (0, 50, 100 e 150 mg/kg de concentrado) não foi observado alteração nos valores pH ruminal (média de 6,6), porém observou-se aumento na proporção molar de C_3 de 19,6 para 24,9 mol/100mol. Com aumento nas

doses destes óleos, houve tendência em aumentar a concentração total de AGCC de 115,2 para 126,2 mM e tendência em reduzir a proporção molar de C_2 de 67,4 para 62,7 mol/100 mol sem afetar a proporção molar de C_4 , com média de 9,8 mol/ 100 mol (GIANNENAS et al., 2011).

Malecky et al. (2009) não observaram diferenças nos valores de pH ruminal e concentração total de AGCC em cabras em lactação tratadas com misturas de monoterpenos nas doses de 0; 0,043 e 0,43 g/kg da matéria seca.

Ao suplementar cabras em lactação com óleos essenciais nas doses de 2mL de óleo de alho, 2 mL de óleo de canela ou 2 mL de óleo de gengibre, não observou-se alteração os valores de pH em relação aos animais alimentados com a dieta controle (sem adição de aditivo; média de 5,92). Porém, houve aumento na concentração total de AGCC, na proporção de propiônico e butirato, redução na concentração de acetato e na relação $C_2 : C_3$ (KHOLIF et al., 2012).

Em um trabalho realizado com vacas secas cruzadas, ao testarem doses (0; 100 e 200 g/animal/dia) de óleo de eucalipto, Manh et al. (2012) não observaram alterações nos valores de pH ruminal. Porém, observaram redução na concentração total de AGCC e acetato (C_2); houve aumento na concentração de propionato (C_3) para dose mais alta. Houve também redução na relação $C_2 : C_3$ para o tratamento com dose mais alta do óleo.

Tekippe et al. (2011), trabalhando com vacas em lactação alimentadas com dietas contendo óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) na dose de 500 g/dia, não observaram alterações nos valores de pH ruminal e concentração total de AGCC. Da mesma forma, Hristov et al. (2013), trabalhando com vacas Holandesas, ao testarem doses de óleo de orégano (0; 250; 500 e 750 mg/vaca/dia), não observaram efeito de tratamento nos valores de pH ruminal (média 6,21), concentração total de AGCC (média 135,6 mM), acetato e propionato (médias 83,2 e 29,9 mM) respectivamente. Porém, houve redução na concentração de butirato 18,3 mM no grupo controle para 17 mM no grupo que foi suplementado com óleo de orégano.

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES

O aumento na ingestão de nutrientes, na digestibilidade e no metabolismo dos alimentos são maneiras eficientes de se melhorar o desempenho produtivo dos animais (MERTENS, 1994).

Segundo Firkins et al. (1998), das variáveis relacionadas com a nutrição e alimentação de ruminantes, a mais importante é a quantificação da digestibilidade dos nutrientes, pois esta variável é influenciada por muitos fatores. Entre eles está a inclusão de aditivos, razão pela qual os óleos essenciais vem sendo estudados, com potenciais manipuladores dessas variáveis.

Estudos *in vitro* foram conduzidos, incentivados pela observação de que certas plantas, contendo óleos essenciais, eram menos consumidas por animais em pastagem, e simultaneamente, reduziam a digestibilidade (OH et al., 1967; NAGY; TENDERGY, 1968). Isso ocorreu logo após os primeiros estudos demonstrarem efeito dos óleos essenciais (CRANE et al., 1957; BORCHERS, 1965).

Equipes de pesquisa continuam se dedicando em desenvolver alternativas eficientes de manipular a fermentação ruminal, tendo como objetivo principal controlar alguns processos metabólicos no rúmen que possam refletir na eficiência de utilização dos nutrientes pelos animais (NAGARAJA, 2003).

Dessa forma, tem sido sugerido que o principal efeito dos óleos essenciais no rúmen é a redução da degradação da proteína e do amido, acompanhado da inibição da degradação dos aminoácidos, por causa da ação seletiva em certos microrganismos ruminais. O primeiro modo de ação proposto é o efeito padrão de colonização bacteriana, em particular à substratos ricos em amido, e o segundo modo de ação está envolvido na inibição de bactérias atuantes na deaminação de aminoácidos (HART et al., 2008).

Estudo realizado por Beauchemin e McGinn (2006) com mistura de óleos essenciais (1 g/dia de Crina® Ruminantes) para bovinos de corte, consumindo dieta rica em forragem, as emissões de CH₄ não foram afetadas e a digestibilidade da dieta diminuiu. Porém, a utilização do mesmo produto comercial em estudo *in vitro* realizada por McIntosh et al. (2003) demonstrou que o crescimento das metanogênicas *Methanobrevibacter smithii* foi inibido, mas apenas quando a concentração do produto foi 33 vezes mais elevada do que aqueles alimentados *in vivo* por Beauchemin e McGinn (2006). Entretanto, essa dosagem pode ser impraticável, devido a possíveis efeitos deletérios sobre a digestibilidade da dieta.

Trabalhando com vacas em lactação, Benchaar et al. (2007) avaliaram duas doses (0 e 750 mg/d) de uma mistura de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno e não observaram influência na digestibilidade da MS, PB, FDN FDA e amido com média de 66,4%, 61,3%, 52,0%, 52,2% 97,4%, respectivamente.

Hristov et al. (2013) trabalharam com vacas em lactação alimentadas com dietas contendo as seguintes doses 0, 250, 500 e 750g/vaca/d de orégano. Os autores observaram tendência de redução na digestibilidade da PB (média de 62,0%), sem efeitos para MS, MO e FDA, com média de 65,6; 66,9 e 46,7%, respectivamente. Porém, observou-se redução na digestibilidade da FDN de 51,3% no grupo que recebeu tratamento controle para 49,3%, média dos grupos que receberam orégano.

Experimentos com novilhos de corte indicaram que a adição de 100 g/d de folhas de citronela secas e moídas aumentou a digestibilidade da MS, diminuiu a concentração de N-AMONIACAL ruminal e de protozoários, além de aumentar o número de bactérias viáveis no rúmen (WANAPAT et al., 2008).

Ao testar duas misturas de óleo essencial composto por timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno em novilhos, Meyer et al. (2009) não observaram efeito sobre a digestibilidade da MS e MO entre os tratamentos com média de 84,3% e 86,0%, respectivamente.

2.5 DESEMPENHO ANIMAL

Ainda são escassas na literatura informações sobre desempenho de ruminantes que receberam óleos essenciais na dieta, talvez devido às pesquisas com óleos essenciais em geral terem sido retomadas a pouco tempo. Com isso, parte dos resultados negativos encontrados em pesquisas *in vivo* pode estar associada ao pouco conhecimento, ou mesmo desconhecimento da forma de ação dos óleos, da interação dos seus constituintes, da melhor maneira de se fornecer, das doses adequadas, da interação com o tipo de dieta, com o ambiente ruminal (ex: pH, taxa de passagem, densidade microbiana, etc.) e produção de metabólitos.

Segundo Araújo (2010), é importante considerar que óleos essenciais e extratos de plantas não são substâncias padronizadas. Por isso apresentam grande variação na concentração e tipos de substâncias ativas. Assim, não é incomum que

resultados *in vivo* sejam contraditórios e inconsistentes, até mesmo para substâncias com efeitos positivos já comprovados *in vitro*.

De acordo com Carvalho et al. (2004), o comportamento ingestivo de um animal pode ser influenciado por fatores físicos (degradação do alimento; fluxo da digesta no trato gastrointestinal) e/ou químicos (excesso de metabólitos na corrente sanguínea). O consumo também pode ser influenciado por fatores relacionados aos alimentos, como aceitabilidade, aparência, tamanho de partícula, textura, odores e fatores ligados aos animais, relacionado ao estado emocional (ex: estresse), interações e aprendizado (MERTENS, 1994).

Foi constatado queda no CMS de novilhas holandesas ao se utilizar óleos essenciais com objetivo de manipular a fermentação ruminal quando foi fornecido, por exemplo, de 180mg/d de cinamaldeído + 90 mg/d de eugenol que resultaram em redução de 16% do CMS (CARDOZO et al., 2006). Da mesma forma, estudos com compostos isolados, canfeno e cariofileno, misturados em pellets de alfafa, resultaram em 16% e 14% de redução no CMS por ovelhas, respectivamente (ESTELL et al., 2002). Doses elevadas de cinamaldeído (500 mg/dia) também promoveu redução no CMS em gado leiteiro (BUSQUET et al., 2003).

Resultados dessa natureza indicam que óleos essenciais podem estar relacionados com problemas de aceitabilidade, o que pode interferir na fermentação ruminal, e com isso no efeito esperado. Uma das alternativas para esse problema, segundo Calsamiglia et al. (2007), pode ser a utilização de óleos encapsulados. No entanto, Cardozo et al. (2006), em um segundo experimento utilizando bovinos de corte canulados, alimentados com eugenol + cinamaldeído encapsulados, não observaram diferença no CMS. Calsamiglia et al. (2007) sugerem que a encapsulação foi bem sucedida na prevenção de problemas da aceitabilidade, reportados em estudos anteriores.

O tipo de óleo essencial pode interferir no CMS, pois ausência de efeito ou mesmo estímulos podem ocorrer. No entanto, Benchaar et al. (2006), ao utilizarem mistura comercial de óleo essencial 2 ou 4g/dia (Vertinan®), não observaram efeito no CMS e ganho médio diário em bovinos alimentados com silagem. Por outro lado, a inclusão de óleo de anis e de pimenta na dieta aumentaram respectivamente em 5% e 9% o CMS por novilhas em relação ao tratamento controle (sem óleo) (CARDOZO et al., 2006). Mais uma vez foi observado que óleo de pimenta aumentou em 11% o CMS (FANDIÑO et al., 2008). Assim como Yang et al. (2010) observaram maior CMS

para dose de 400mg/dia de cinamaldeído em novilhos recém chegados (até 28 dias) em confinamentos. Dessa maneira, definir a quantidade adequada a ser fornecida é um dos fatores importantes para que se tenha sucesso no uso de óleos essenciais, com o objetivo de maximizar o desempenho animal.

Resultados promissores foram observados com o produto comercial Crina Ruminants®, onde o grupo que recebeu o produto em associação com a tilosina e o grupo que recebeu monensina em associação com a tilosina apresentaram a mesma eficiência alimentar e ambos foram superiores ao controle (0,153; 0,156 e 0,145), respectivamente (MEYER et al., 2009).

Experimento utilizando o produto comercial Vertan® (timol, eugenol, vanilina e limoneno), na alimentação de novilhos, proporcionaram aos animais uma eficiência alimentar de 0,145; 0,158; 0,154 e 0,130 para o grupo controle, monensina e 2 ou 4 g/dia do produto, respectivamente (BENCHAAAR; DUYNISVELD; CHARMLEY, 2006).

Outro produto comercial que mostra o potencial dos óleos essenciais é o Biostar® (extratos de cinarina, ginseng e feno-grego). Bovinos confinados recebendo este produto apresentaram valores de peso vivo final e ganho médio diário (GMD) intermediários entre tratamento controle e monensina (DEVANT et al., 2007).

Com relação a cordeiros confinados, o carvacrol e ou cinamaldeído (200 mg/kg MS) não alteraram o CMS, o GMD e os rendimentos de carcaça e cortes. Mesmo assim, o GMD foi numericamente superior para cinamaldeído, carvacrol em relação ao grupo controle (312; 309 e 288, respectivamente). Uma questão interessante foi que a avaliação sensorial das carnes não diferiu entre os tratamentos (CHAVES et al., 2008).

Óleo de zimbro (*Juniperus communis*) ou cinamaldeído (200 mg/kg de MS) apresentaram resultados positivos com cordeiros confinados. Os animais apresentam GMD de 254, 250 e 217g para óleo de zimbro, cinamaldeído e controle, respectivamente. A conversão alimentar e concentração ruminal de propionato apresentou melhora numérica e, mais uma vez, não houve efeito sobre os atributos sensoriais da carne, com mínima interferência no perfil de ácidos graxos (CHAVES et al., 2008).

Esses trabalhos ajudam a desmistificar a ideia de que óleos essenciais podem alterar o sabor e a qualidade da carne. Lembrando que monoterpenos e sesquiterpenos podem ser encontrados no tecido adiposo de carneiros, mantidos tanto em confinamentos como em pastagens naturais (PRIOLO et al., 2004).

REFERÊNCIAS

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 64, n. 3, p. 403-412, 2005.

ANASSORI, E.; DALIR-NAGHADEH, B.; PIRMOHAMMADI, R.; TAGHIZADEH, A.; ASR-REZAEI, S.; MAHAM, M.; FARAHMAND-AZAR, S.; FARHOOMAND, P. Garlic: a potential alternative for monensin as a rumen modifier. **Livestock Science**, v. 142, p. 276-287, 2011.

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010, 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 209-228, 2008.

BENCHAAAR, C.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; WANG, Y.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T.A. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, n. 3, p. 413-419, 2007.

BENCHAAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 1, p. 91-96, 2006.

BORCHERS, R. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, n. 4, p. 1033-1038, 1965.

BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Acidosis, rate of starch digestion and intake. In: FEED INTAKE SYMPOSIUM, 1987, Oklahoma. Proceedings... Oklahoma State University, Oklahoma, 1987. p. 125-137.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223- 253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARRO, M. D.; KAMEL, C. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 2, p. 761-771, 2006.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARDOZO, P.W.; KAMEL, C. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2508-2516, 2005a.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARRO, M.D.; KAMEL, C. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4393-4404, 2005b.

BUSQUET, M.; GREATHEAD, H.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Efecto del extracto de ajo y el cinemaldehído sobre la producción, composición y residuos en leche en vacas de alta producción. **ITEA**, v. 24, p. 756-758, 2003.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a highconcentrate diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2801-2808, 2006.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 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**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 3230-3236, 2004.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO, G. G. P.; PIRES, A. J. V.; SILVA, F. F.; VELOSO, C. M.; SILVA, R. R.; SILVA, H. G. O.; BONOMO, P.; MENDONÇA, S. S. Comportamento ingestivo de cabras leiteiras alimentadas com farelo de cacau ou torta de dendê. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília. v.39, n.9, p.919-925. set. 2004.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. A.; LOSA, R. Effects of a specific blend of essential oils compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 119, p. 29-41, 2005

CHAVES, A. V.; HE, M. L.; YANG, W. Z.; HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; BENCHAAAR, C. Effects of essential oils on the proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2008.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRANE, A.; NELSON, W. O.; BROWN, R. E. Effects of D-limonene and α -D pinene on in vitro carbohydrate dissimilation and methane formation by rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 40, n. 10, p. 1317-1323, 1957.

Deans, S. G.; Ritchie, G. **Antibacterial properties of plant essential oils**. International Journal Food Microbiology, v. 5, p. 165–180, 1987.

DEVANT, M.; ANGLADA, A.; BACH, A. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 46- 57, 2007.

DORMAN, H. J. D.; Deans, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, v. 88, p. 308–316, 2000.

ESTELL, R. E.; FREDRICKSON, E. L.; ANDERSON, D. M.; HAVSTAD, K. M.; REMMENG, M. D. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3301-3306, 2002.

EVANS, J. D.; MARTIN, S. A. Effect of thymol on ruminal microorganisms. **Current Microbiology**, v. 41, p. 336-340, 2000.

FADIÑO, I.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; BLANCH, M. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify to rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 1/4, p. 409-417, 2008.

FERME, D.; BANJAC, M.; CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; KAMEL, C.; AVGUSTIN, G. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. **Folia Microbiologica**, Praga, v. 49, n. 2, p. 151-155, 2004.

FIRKINS, J. L.; ALLEN, M. S.; OLDICK, B. S.; ST-PIERRE, N. R. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates microbial protein flow to the duodenum. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 3350-3369, 1998.

FRASER, G. R.; CHAVES, A. V.; WANG, Y.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; BENCHAAAR, C. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2315-2328, 2007.

GIANENNAS, I.; SKOUFOS, J.; GIANNAKOPOULUS, C.; WIEMANN, M.; GORTZI, O.; LALAS, S.; KYRIRIAZAKIS, I. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 123-130, 2011.

HART, K. J.; YÁÑEZ-RUIZ, D. R.; DUVAL, S. M.; McEWAN, N. R.; NEWBOLD, C. J. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 8-35, 2008.

HRISTOV, A. N.; LEE, C.; CASSIDY, T.; HEYLER, K.; TEKIPPE, J. A.; VARGA, G. A.; CORL, B.; BRANDT, R. C. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1189-1202, 2013.

HUTTON, P.; WHITE, C. L.; DURMIC, Z.; VERCOE, P. E. *Eremophila glabra* is an Australian plant that reduces lactic acid accumulation in an *in vitro* glucose challenge designed to simulate lactic acidosis in ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 3, n. 9, p. 1254-1263, 2009.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. **Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents.** **Journal Applied Bacteriology**, v. 76, p. 626–631, 1994.

KHAN, M. M. H.; CHAUDHRY, A. S. Chemical composition of selected forages and spices and effect of the spices on *in vitro* rumen degradability of some forages. Asian-Australas. **Journal of Animal Science**, v. 23, p. 889-895, 2010.

KLEVENHUSEN, F.; ZEITZ, J. O.; DUVAL, S.; KREUZER, M.; SOLIVA, C. R. Determination of the methane mitigating potential of garlic oil and one its most abundant compounds – diallyl disulfide – in sheep. In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 4., 2010, Banff. **Proceedings...** Banff, 2010. p. 126.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, H. M.; VIGENSCHOW, H. Action of terpenoids on energy metabolism. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ESSENTIAL OILS, 16, 1986, Berlin. **Proceedings...** Berlin: De Gruyter, 1986. p. 429-445.

KHOLIF, S. M.; MORSY, T. A.; ABDO, M. M.; MATLOUP, O. H.; ABU EL-ELLA, A. A. Effect of supplementing lactating goats rations with garlic, cinnamon or ginger oils on milk yield, milk composition and milk fatty acids profile. **Journal Life Science**, v. 4, p. 27-34, 2012.

KOSLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

MALECKY, M.; BROUDISCOU, L. P.; SCHMIDELY, P. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 154, n. 1/2, p. 24-35, 2009.

MANH, N. S.; WANAPAT, M.; URIYAPONGSON, S.; KHEJORNART, P.; CHANTHAKHOUN, V. Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. **African Journal Agriculture Research**, v. 7, p. 1997-2003, 2012.

McALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East elbourne, v. 48, n.1/2, p. 7-13, 2008.

McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J.; BEEVER, D. A.; NEWBOLD, C.J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 5011-5014, 2003.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: Forage quality, evaluation and utilization. Madison: **American Society of Agronomy**, v. 4, n. 5, p. 450-493, 1994

MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; LUEBBE, M. K.; WILLIAMS, P.; ENGSTROM, M. A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 2346-2354, 2009.

MOHAMMED, N.; AJISAKA, N.; LILA, Z. A.; MIKUNI, K.; HARA, K.; KANDA, S.; ITABASHI, H. **Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation in vitro and in steers.** **Journal Animal Science**, v. 82, p. 1839–1846, 2004.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; MANN, S. O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects on type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, v. 10, p. 15-30, 1983.

NAGARAJA, T. G. Response of the gut and microbial populations to feedstuffs: the ruminant story. In: MINNESOTA NUTRITION CONFERENCE, 64., 2003, St.Paul, MN. **Proceedings...** 2003. p. 64-77.

NAGY, J. G.; TENDERGY, R. P. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of volatile oils of *Artemisia tridentate* (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. **Applied Microbiology**, Washington, v. 16, n. 3, p. 441-444, 1968.

NEWBOLD, C. J.; McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 114, n. 1/4, p. 105-112, 2004.

OH, H. K.; SAKAI, T.; JONES, M. B.; LONGHURST, W. M. Effect of various essential oils isolated from Douglas fir neegles upon sheep and deer rumen microbial activity. **Applied Microbiology**, Washington, v. 15, n. 4, p. 777-784, 1967

OJEU. **Regulation (EC) No 1831/2003 of the European parliament and the council of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition**. Aberdeen United Kingdom: **Official Journal of the European Union**, L268, 2003. p. 29-43, 2003. Disponível em: <http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2010.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J.-P.; BÉGIN, A. **Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms**. **International Journal Food Microbiology**, v. 37, p. 155–162, 1997.

PATRA, A. K, YU Z.; Essential oils affect populations of some rumen bacteria *in vitro* as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6 p. 297, 2015.

POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade Biológica e Sistemas de Classificação. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. UFSC, 2004.1102 p,

PRIOLO, A.; CORNU, A.; PRACHE, S.; KROGMANN, M.; KONDJAYAN, N.; MICOL, D.; BERDAGUÉ, J. -L. Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. **Meat Science**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 475-481, 2004.

RALPHS, M. H.; GARDNER, D. R.; PFISTER, J. A. Toxophenology and grazing risk models of tall larkspur. In: ACAMOVIC, T.; STEWART, C., S.; PENNYCOTT, T. W. **Poisonous plants and related toxins**. Wallingford, Oxon: CAB International, 2004. p. 575–581.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca: [s.n.], 2002. p. 119.

RUSSEL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 39, p. 604, 1980.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa, 2000. 48 p. Embrapa meio ambiente. Documentos.

SALLAM, S. M. A.; NASSER, M. E. A.; ARAUJO, R. C.; ABDALLA, A. L. Methane production by sheep consuming diets with different levels of eucalyptus essential oil. In: FAO/IAEA INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE IMPROVEMENT OF ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH, 2009, Vienna. **Proceedings...** Vienna: FAO/IAEA, 2009. p. 210-211.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: Ed. da UFSC, 2004. 1102 p.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202–1205, 1996.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology** v. 26, p. 118–122, 1998.

TARGER, L. R.; KRAUSE, K. M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2455-2464, 2011.

TEKIPPE, J. A.; HRISTOV, A. N.; HEYLER, K. S.; KASSIDY, T. W.; ZHELJAZKOV, V. D.; FERREIRA, J. F. S.; KARNATI, S. K.; VARGA G. A. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L leaves in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 5065-5079, 2011.

THAO, N. T.; WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; KANG, S. Effects of eucalyptus crude oils supplementation on rumen fermentation, microorganism and nutrient digestibility in swamp buffaloes. **Journal of Animal Science**, v. 27, p. 46-54, 2014.

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, 1561-1568, 2002.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Effect of monensin on rumen metabolism *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 3, p. 251-257, 1977.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Comstock: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VILLALBA, J. J.; PROVENZA, F. D. Challenges in extrapolating *in vitro* findings to *in vivo* evaluation of plant resources. In: VERCOE, P. E.; MAKKAR, H. P. S.; SCHLINK, A. C. (Ed.). ***In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies**. London: Springer, 2010. Chap. 11, p. 233-242.

WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A.; PAKDEE, P.; WANAPAT, S. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder supplementation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 12, p. 3497-3503, 2008.

WANG, C. J.; WANG, S. P.; ZHOU, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 148, n. 2-4, p. 157-166, 2009.

WILLIAMS, L. R.; STOCKLEY, W. Essential oils with high antimicrobial activity for therapeutic use. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 8, n. 4, Oct. /Dec. 1998.

YANG, W. Z.; AMETAJ, B. N.; BENCHAAR, C.; BEAUCHEMIN, K. A. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: ruminal and intestinal digestion. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 680-688, 2010.

3 EXPERIMENTO I: TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris*) COMO MANIPULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL DE OVINOS EM DIETAS COM ALTO TEOR DE CONCENTRADO

3.1 INTRODUÇÃO

A manipulação da fermentação ruminal é uma ferramenta de grande valor para nutricionistas e técnicos, visando aumentar a produtividade. Assim, melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes, por ruminantes, em especial, buscando reduzir perdas energéticas e quantidade de poluentes (ex.: CH₄), para isso uma das maneiras é o uso de aditivos. O qual pode auxiliar na manipulação da fermentação ruminal de maneira desejável e, com isso, melhorar o desempenho animal.

Dentre as diversas alternativas, uma delas é a utilização de ionóforos (ex.: monensina sódica). Uma outra, são os óleos essenciais, que são compostos secundários de plantas, os quais surgem com grande expectativa de uso, por apresentarem diversos princípios ativos que, utilizados em sinergia ou isolados, conferem diversos modos de ação, dificultando o aparecimento de uma possível resistência (ACAMOVIC; BROOKER, 2005).

Além do que, esses compostos secundários possuem uma vantagem em relação aos antibióticos, banidos pela União Europeia como promotores de crescimento (OJEU, 2003), por serem aceitos pelos consumidores e agências reguladoras como seguros para o consumo humano, por alguns possuírem o status GRAS (*generally recognized as safe*).

Esses compostos secundários das plantas, são estruturados, geralmente em três grupos: saponinas, taninos e óleos essenciais. Os efeitos e mecanismos de ação de saponinas e taninos sobre a fermentação no rúmen são bem pesquisados. No entanto, o conhecimento sobre os óleos essenciais ainda é limitado, pois suas propriedades e mecanismos de ação são muitas vezes sobrepostas e as diferenças são difíceis de determinar (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Como a maioria dos trabalhos até o momento foram realizados em sistemas *in vitro*, mais pesquisas *in vivo* são necessárias para se determinar os efeitos desses compostos no rúmen e no metabolismo animal. Alguns trabalhos mostram ação dos

óleos essenciais: como redução na deaminação, taxa de produção de amônia no rúmen, e com isso maior escape de nitrogênio para o intestino; redução na produção de metano, diminuindo perdas energéticas e poluição ambiental; e até redução no lactato (BORCHERS, 1965; EVANS; MARTINS, 2000; CASTILLEJOS et al., 2006; CALSAMIGLIA et al., 2007; ARAÚJO, 2010).

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho avaliar se o óleo de tomilho exerce efeito na fermentação ruminal e, conseqüentemente, no metabolismo de ovinos confinados, bem como avaliar o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes e balanço de nitrogênio, em dietas com 90:10 (concentrado:volumoso).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido nas instalações para estudos metabólicos com ovinos do Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), entre os meses de julho e agosto de 2013.

3.2.2 Animais e instalações experimentais

Foram utilizados 20 ovinos ½ Dorper x ½ Santa Inês, machos castrados com peso médio de 64 ± 10 kg (média $\pm$ desvio padrão) e aproximadamente doze meses de idade, canulados no rúmen. Antes do início do período experimental os animais foram vermifugados (Dectomax®, Pfizer Animal Health, Exton, PA, EUA) na dosagem de 1 mL/50 kg peso vivo em via subcutânea e alojados em baias individuais providas de comedouros e bebedouros. No período de adaptação os animais foram mantidos em baias individuais de piso ripado e foram alimentados *ad libitum*, do dia zero ao dia 18 (dezoito) e depois foram levados para gaiolas para ensaios de metabolismo com

dimensões de 1,30 x 0,55m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina.

3.2.3 Período experimental e delineamento

O período experimental teve duração de 23 dias. Durante 18 dias os animais foram mantidos em baias individuais de piso ripado para adaptação as dietas experimentais e então foram levados para as gaiolas para ensaios de metabolismo e mantidos por quatro dias para mensuração do CMS, colheita de fezes e de urina e um dia destinado à colheita de conteúdo ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental de blocos completos casualizados, sendo cinco blocos e quatro tratamentos. Os animais foram blocados de acordo com o peso corporal.

3.2.4 Tratamentos experimentais

Avaliou-se o efeito de aditivos (monensina ou teores de óleo essencial de tomilho) em dietas contendo elevado teor de concentrado para ovinos confinados. As dietas continham 90% de concentrado e 10% de volumoso (Tabela 2), formuladas de acordo com as recomendações do SRNS (CANNAS et al., 2004) para atender as exigências de PB para ovinos na fase de terminação e conterem a mesma concentração de proteína bruta.

A composição química do óleo essencial de tomilho está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química do óleo essencial de tomilho

Constituinte ¹	%
α -pineno	3,3
Canfeno	1,0
β -pineno	0,6
Mirceno	1,7
p-cimeno	38,9
Limoneno	0,8
1,8-cineol	1,2
γ -terpineno	0,3
Linalool	3,8
Timol	46,6

¹Analisado por cromatografia gasosa de alta resolução, Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química – UFMG.

A proporção dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, %MS e %MN

	Tratamentos ¹			
	MON	1,25TO	2,5TO	3,75TO
Ingredientes				
Feno de “coastcross”	10,00	10,0	10,0	10,0
Milho moído	69,975	69,85	69,75	69,625
Farelo de soja	16,2	16,2	16,2	16,2
Calcário calcítico	1,60	1,60	1,60	1,60
Cloreto de amônia	0,40	0,40	0,40	0,40
Mistura mineral ²	1,80	1,80	1,80	1,80
Rumensim® 100 ³	0,025	-	-	-
Óleo essencial de tomilho	-	0,15	0,250	0,375
Composição química				
Matéria seca (% da MN)	91,0	91,0	90,0	91,0
Matéria orgânica (% da MS)	93,9	93,7	94,0	93,6
Proteína bruta (% da MS)	14,8	14,8	14,9	15,1
Fibra insolúvel em detergente neutro (% da MS)	22,2	22,8	24,4	22,9
Energia metabolizável, Mcal/kg de MS ⁴	2,5	2,5	2,5	2,5

¹ MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,5TO – adição de 2,5 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ²Composição: 5,5% P; 22% Ca; 3,5% Mg; 2,2% S; 7,0% Na; 500 ppm Fe; 450 ppm Cu; 1550 ppm Zn; 20 ppm Se. ³Rumensin 100 (monensina sódica, Elanco do Brasil, São Paulo). ⁴Estimada usando o *Small Ruminant Nutrition System*, v. 1.8.6 (CANNAS et al., 2004).

As dietas experimentais foram as seguintes:

- 1 - Ração base + 25 mg de monensina sódica por kg/MS: MON.
- 2 – Ração base + 1,25 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 1,25TO
- 3 - Ração base + 2,5 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 2,50TO
- 4 - Ração base + 3,75 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 3,75TO

3.2.5 Manejo alimentar

O feno de “coastcross” foi picado grosseiramente e o milho foi moído utilizando-se um picador moedor (Nogueira® DPM – 4, Itapira, Brasil) provido de peneira com crivos de 10 mm. Em seguida foram misturados o farelo de soja, o calcário calcítico, a mistura mineral e, no caso do tratamento MON, a monensina sódica (Rumensin® 100, Elanco do Brasil, São Paulo, Brasil) utilizando-se um misturador horizontal com capacidade para 500 kg (Lucato®, Limeira, Brasil). Por se tratar de quantidade pequena, e para maior controle da quantidade fornecida, os óleos essenciais utilizados nos demais tratamentos foram misturados diariamente na dieta de cada animal momentos antes do fornecimento. O cálculo da quantidade de óleo utilizado era realizado diariamente em função da quantidade ofertada (Figura 1).

Figura 1 - Mistura do óleo essencial na dieta

Fonte: arquivo pessoal

Durante todos os dias do período experimental, as rações foram pesadas em balança eletrônica (Marte, AC 10K, São Paulo, Brasil) de precisão e ofertadas *ad libitum* duas vezes ao dia às 7:00 horas da manhã e às 19 horas; no dia seguinte às 7:00 horas da manhã as sobras da ração ofertada no dia anterior foram pesadas para obtenção do CMS por animal e retornadas para o animal, a qual foi computada para quantificar a oferta para o dia seguinte. A oferta diária era ajustada visando manter as sobras entre 10% e 5% da quantidade ofertada no dia anterior. Os animais tiveram acesso *ad libitum* à água fresca durante todo o experimento.

3.2.6 Colheita de amostras de conteúdo ruminal para análise de N- amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

No dia zero (dia anterior ao início do fornecimento das dietas experimentais), 7, 14 e 23, do período experimental amostras de conteúdo ruminal foram coletadas manualmente às 0, 3, 6, 9 e 12 horas após o fornecimento matinal das rações. Logo após a colheita, as amostras foram filtradas em tecido de nylon de 150 micras, sendo em seguida realizada a leitura do pH utilizando-se potenciômetro digital (DIGIMED® DM20; Figura 2). Desse fluido filtrado foram retiradas 2 alíquotas de 25 mL, que foram imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C para posterior determinação da concentração de AGCC e N-amoniacal. Para as análises de AGCC e N-amoniacal, as amostras colhidas nas diferentes horas de cada dia foram compostas para representarem o dia.

Figura 2 - Colheita de conteúdo ruminal e aferição de pH

Fonte: arquivo pessoal

3.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Após o período de adaptação, no dia 18, os animais foram pesados e alocados nas gaiolas para ensaio metabólicos, para avaliação do consumo, digestibilidade e parâmetros ruminiais. Nos dias 19, 20, 21 e 22 do período experimental, as 7:00 horas

da manhã, a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foram mensurados. As sobras e as fezes foram pesadas em balança eletrônica (Marte AC 10K, São Paulo, Brasil) de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, foram colhidas amostras (10%) da produção fecal e de urina diária e imediatamente congeladas a -20 °C. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos colhedores das gaiolas em recipientes contendo ácido clorídrico à 50%, sendo o volume de ácido suficiente para manter o pH da urina abaixo de 3.

Nos mesmos dias em que foram colhidas amostras de fezes e urina, foi mensurado o consumo da dieta e colhidas amostras da ração ofertada. E no dia 22 foi colhido 10% das sobras.

Amostras da ração ofertada, das fezes e da urina foram compostas por animal e conservadas a -20°C para posteriores análises.

Todos os animais foram pesados, no dia zero, dia 18 (dezoito) e no último dia do período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

3.2.8 Análises laboratoriais e cálculos

3.2.7.1 Ração ofertada, sobras e fezes

Depois de descongeladas, as amostras das sobras e das fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Em seguida, todas as amostras, incluindo rações ofertadas, foram moídas em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba, Brasil) com peneiras com crivos de 1,0 mm. O teor de matéria seca (MS) final das amostras foi determinado por meio da secagem em estufa a 105°C por 24 h. A matéria mineral (MM) foi obtida por meio da incineração da amostra em mufla a 550°C por 4 h (ASSOCIATION OF AFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTIS - AOAC, 1990). A concentração de N total foi determinada através da combustão da amostra utilizando um aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a AOAC (1997). A concentração de FDN foi determinada conforme Van Soest; Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho

Ankom A2000 (Ankom Tech. Corp., Macedon, NY). O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado pelo método Microkjeldahl (AOAC, 1997).

3.2.7.2 AGCC e N-amoniacal

Para determinação dos AGCC; 1,6 mL de fluido ruminal adicionado de 0,4 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% e 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) foram centrifugados (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação 1,2 mL de cada amostra foi transferido para *vials* cromatográficos. Do extrato obtido foi injetado 1 µL em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) equipado com coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25 m; 0,320 mm; 0,50 µm; J&W 18 Agilent Technologies). A injeção foi realizada de maneira automática, o gás de arraste foi o H₂, mantido em um fluxo de 31,35 mL/min. A temperatura do injetor e detector foi de 260 °C. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 16,5 minutos (min.) dividido em três rampas de aquecimento, como segue: 80 °C (1 min), 120 °C (20 °C/min; 3 min), 205 °C (10 °C/min; 2 min). A concentração dos AGCC (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa.

A concentração de N-AMONIACAL foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (Eon, Biotek instruments, Winooski, USA), utilizando-se filtro para absorbância de 550 nm.

3.2.7.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do SAS (2002), considerando efeito significativo quando $P < 0,05$ e tendência para $P < 0,10$. Todos os dados foram avaliados quanto a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro Wilk), retirada de outliers (observações que apresentaram valores de resíduo estudentizado < -3 ou $> +3$) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). O conjunto de dados que não respeitou tais premissas foi submetido às transformações logarítmicas, inversa ou raiz quadrada.

Os dados relacionados à fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo. O modelo estatístico empregado foi: $Y_{ijk} = \mu + T_j + B_k + C_v + E_{ijkv} + D_r + (TD)_{jr} + (BD)_{kr} + E_{ijkvr}$, onde μ = média geral; T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 4); B_k = efeito de bloco ($k = 1$ a 5); C_v = efeito da covariável; E_{ijkv} = erro residual A; D_r = efeito de Dia ($r = 7, 14$ e 23); $(TD)_{jr}$ = efeito da interação tratamento x dia; $(BD)_{kr}$ = efeito da interação entre bloco x dia, e E_{ijkvr} = erro residual B. Blocos e interação bloco x dia foram incluídos como efeitos aleatórios. As análises realizadas no material colhido no dia zero (dia anterior ao fornecimento das dietas) foi utilizado como covariável. As matrizes de covariância “compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, autoregressive, heterogeneous autoregressive, unstructured, banded, variance components, toeplitz e heterogeneous toeplitz” foram testadas e definidas de acordo com o menor valor obtido para “Akaike’s Information Criterion” (AIC). As médias dos tratamentos foram obtidas através do comando LSMEANS. Os efeitos de tratamento, dia e interação tratamento x dia foram definidos pelo teste F da análise de variância, quando significativa ($P < 0,05$), desdobrada por comparação de médias usando a opção PDIFF do SAS. Em caso de efeito de tratamento, o conjunto de dados foi submetido ao teste de Tukey.

Os dados de digestibilidade aparente dos nutrientes foram analisados através do modelo: $Y_{ijk} = \mu + T_j + B_k + E_{ijk}$, onde μ = média geral; T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 4); B_k = efeito de bloco ($k = 1$ a 5), e E_{ijk} = erro residual. O bloco foi incluído como efeito aleatório. As médias dos tratamentos foram obtidas através do comando LSMEANS. O efeito de tratamento foi definido de acordo com o teste F da análise de variância e em caso de significância, o conjunto de dados foi submetido ao teste de Tukey.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal médio (PC) dos animais ao longo do período experimental foi: 66,4; 61,2; 63,6 e 65,7; para os tratamentos MON, 1,25TO, 2,50TO e 3,75TO, respectivamente.

Não houve efeito no CMS dos animais, Tabela 3. Na dose de 1,25 mL, a adição do óleo de tomilho não apresentou diferença quando comparada com o tratamento

MON (1,92). Os efeitos dose-dependentes dos óleos essenciais foram demonstrados, ao se fornecer 0, 400, 800 e 1600 mg/dia de cinamaldeído para novilhas, onde o efeito foi quadrático (YANG et al., 2010).

O fornecimento de 180 mg/dia de cinamaldeído + 90 mg/dia de eugenol reduziu em 16% o CMS e óleos de anis e pimenta aumentaram, respectivamente, em 5% e 9% o CMS por novilhas (CARDOZO et al., 2006). Entretanto, Benchaar *et al.* (2006) não observaram efeito sobre o CMS, em bovinos alimentados à base de silagem e suplementados com 2 ou 4 g/dia de Vertan® (mistura comercial de óleos essenciais).

Da mesma forma, Benchaar et al. (2007); Benchaar (2008); Tekippe et al. (2013) não verificaram diferença no consumo de matéria seca. Em outros estudos, Cardozo et al. (2006); Fandiño et al. (2008) deixaram claro que a ação de alguns óleos essenciais estimula o CMS (ex.: óleo essencial de pimenta). Portanto, a necessidade de estudo sobre o assunto é grande.

O consumo de matéria seca (CMS), o consumo de proteína bruta (CPB) e fibra em detergente neutro (CFDN) (kg/dia) não foram afetados pelos tratamentos ($P > 0,05$).

A ausência de efeitos sobre as variáveis CMS, CMO, CFDN e CPB deve ser visto de maneira positiva, visto que os efeitos positivos da monensina sobre a eficiência alimentar, nitrogênio e utilização de energia são bem conhecidos (PLAIZIER et al., 2000; TEDESCHI et al., 2003). Assim, acredita-se que o óleo essencial de tomilho pode ter os mesmos efeitos sobre a digestão de nutrientes, sugerindo que pode também atuar sobre espécies de bactérias celulolíticas. Contudo, em teores mais elevados, esses valores começam a ficar piores do que da monensina.

Desta forma, não houve também diferença sobre a digestibilidade aparente dos nutrientes ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes pelos ovinos alimentados com as dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis ⁴	Dietas ¹				EPM ²	Valor de <i>P</i> ³
	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		
Consumo (kg/dia)						
MS	1,92	1,92	1,63	1,79	0,08	0,09
MO	1,81	1,80	1,54	1,68	0,08	0,09
FDN	0,43	0,44	0,40	0,41	0,02	0,54
PB	0,29	0,29	0,25	0,27	0,01	0,12
Digestibilidade, %						
MS	85,3	88,2	85,1	83,8	1,64	0,41
MO	87,2	90,1	87,5	86,4	1,55	0,50
FDN	68,8	76,4	70,7	67,4	3,84	0,49
PB	83,9	87,5	83,5	82,0	1,92	0,36

¹MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,5TO – adição de 2,5 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base.²EPM = Erro padrão da média. ³Valor de *P* = médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). ⁴MS = matéria seca; FDN = fibra em detergente neutro; PB = proteína bruta; MO = matéria orgânica; MM = matéria mineral.

Como não houve diferença entre a quantidade e a qualidade do alimento consumido, não houve diferença entre os tratamentos com óleos essenciais e o contendo monensina. Oh et al. (1967, 1968) sugeriram que a baixa aceitabilidade de algumas plantas para com os ruminantes pode não ser apenas devido aos efeitos organolépticos, mas também pelo seu efeito negativo sobre a fermentação microbiana e a digestão dos nutrientes. Levando em consideração alguns trabalhos (EVANS; MARTIN, 2000; CARDOZO et al., 2004; CALSAMIGLIA et al., 2007; GLADINE et al., 2007; BENCHAAR et al., 2008), surge a hipótese de que, pode haver uma adaptação dos microrganismos ruminais aos produtos durante o período de adaptação.

Ao trabalharem com vacas em lactação Benchaar et al. (2007) testaram duas doses (0 e 750 mg/d) de uma mistura de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno. E não observaram influência na digestibilidade da MS, PB e FDN com médias de 66,4%, 61,3%, 52,0%, respectivamente. Da mesma forma, não houve diferença na digestibilidade dos nutrientes em vários estudos (BENCHAAR et al., 2008; MALECKY et al., 2009; MEYER et al., 2009; SANTOS et al., 2010; TARGER; KRAUSE, 2011).

A digestibilidade da FDN e PB no trato digestivo total não foi afetada pelos tratamentos ($P > 0,05$; Tabela 3). Isso indica que as alterações que óleo essencial de tomilho provoca na microbiota ruminal é semelhante à monensina, que, segundo Castillejos et al. (2006), reduz a digestão da MS, MO, FDN e FDA, da mesma forma que 500 mg/L de timol. Plaizier et al. (2000) relataram que monensina aumentou a digestibilidade aparente da FDN em vacas alimentadas com dietas ricas em forrageiras, ao passo que não houve efeito sobre a digestão de fibra em vacas alimentadas com dietas com alto teor de concentrado. Benchaar et al. (2006) relataram que a digestibilidade aparente da PB foi maior para vacas alimentadas com dietas suplementadas com monensina em comparação às que não receberam monensina (65,0 vs. 63,6%).

Hristov et al. (2013) testaram óleo essencial de orégano, em vacas lactantes, e observaram redução na digestibilidade da FDN de 51,3% no grupo controle (sem óleo) para 49,3% nos grupos que receberam doses de óleo e não encontraram efeito para digestibilidade da PB (62,4%). Anassori et al. (2011) também observaram redução na digestibilidade da FDN trabalhando com óleo essencial de alho em ovinos e não observaram efeito para tratamento com alho puro.

Não houve efeito dos tratamentos para as concentrações de propionato. E as concentrações de acetato e valerato foram semelhantes entre os tratamentos. Porém sofreram influência do dia de colheita ($p < 0,05$; Tabela 5). Onde o resultado comum de suplementação com monensina é o aumento de propionato e diminuição nas concentrações de acetato e N-amoniacal (RICHARDSON et al., 1976; RUSSEL; STROBEL, 1988; WALLACE et al., 2002; BUSQUET et al., 2005; BENCHAAAR et al., 2006). Vale ressaltar que este efeito também depende do tipo de dieta, em que, em animais mantidos em pastagens, a monensina proporcionou uma relação $C_2:C_3$ de 2,5/1,0 e, para animais alimentados com dietas ricas em grãos, esta relação foi ao redor de 1/1 (RUSSEL, 2002).

Por isso, experimentos de curto prazo devem ser avaliados com cuidado. Evans e Martin (2000) em estudo *in vitro* com adição de orégano, que tem como principais compostos secundários carvacrol e timol, assim como o tomilho, relataram que os efeitos sobre a proporção de C_2 e C_3 desapareceram após 5 e 6 dias de incubação, respectivamente. Os mesmos efeitos foram observados por Cardozo et al. (2004), para óleos essenciais de cinamaldeído, alho, anis e orégano, que afetaram a

proporção molar de C₂ e C₃ e C₄, entre os dias dois e seis de fermentação, não havendo mais diferença após o dia seis.

Em comparação ao tratamento com monensina, a proporção ruminal de butirato apresentou uma tendência de aumento ($P = 0,08$), com a inclusão de 3,75mL de óleo essencial de tomilho por quilograma de matéria seca da dieta. Essa mesma tendência de aumento foi encontrado com relação ao dia de colheita (Tabela 4). A produção de butirato é normalmente reduzida por monensina, pois ionóforos inibem a maior produtora de butirato, a bactéria gram-positiva *Butyrivibrio fibrisolvens* (RUSSELL; STROBEL, 1989; RUSSELL, 2002). Queda na proporção molar de butirato foi observada *in vitro* ao se incluir monensina a 10 mg/L de conteúdo ruminal (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006). Em trabalho *in vitro* realizado por Araújo (2010), com os óleos de erva baleeira, aroeira e copaíbas, a concentração de butirato foi menor ($P < 0,05$) para monensina. No entanto, Kholif et al. (2012), suplementando cabras em lactação com 2mL de óleo de alho, observam aumento na concentração total de AGCC, propionato e butirato, bem com a redução na concentração de acetato e na relação C₂:C₃.

Tabela 4 - Proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal e pH ruminal dos ovinos alimentados com dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis	Dietas ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		Dieta	Dia	Dieta*Dia
AGCC, mM/100mM								
Acetato	54,22	52,02	51,33	55,62	1,96	0,42	0,01	0,46
Propionato	30,19	34,06	34,59	26,48	2,62	0,16	0,01	0,52
Isobutirato	1,01	0,83	0,90	0,97	0,09	0,46	0,79	0,34
Butirato	9,82	9,32	10,18	13,51	1,10	0,08	0,08	0,59
Isovalerato	2,38	1,85	1,62	2,19	0,44	0,67	0,56	0,61
Valerato	1,28	1,52	1,46	1,33	0,10	0,43	0,02	0,15
Acetato:propionato ⁴	2,06	1,83	1,70	2,30	0,22	0,29	0,05	0,20
AGCC Total ⁵	88,5	98,1	95,9	101,4	5,80	0,54	0,12	0,52
N-amoniacoal, mg/dL	19,1	20,3	22,3	22,4	2,00	0,60	<0,01	0,37
pH	5,92	5,77	5,75	5,84	0,03	0,19	0,70	0,09

¹MON = dieta com adição de monensina sódica; 1,25TO = adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 2,50TO = adição de 2,50 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 3,75TO = adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta. ²EPM = Erro padrão da média. ³Dieta = efeito de dieta; Dia = efeito de dia de colheita; Dieta x Dia = Efeito da interação entre dieta e dia. ⁴Relação acetato:propionato

⁵ AGCC total = ácidos graxos de cadeia curta total

Não houve efeito de dieta e nem dia de colheita sobre a concentração total de AGCC. Fraser et al. (2007), trabalharam com cinamaldeído, também não encontraram efeito ($P = 0,60$) na concentração total de AGCC, porém houve tendência de interação para dia de amostragem e tratamento na proporção molar de propionato. Da mesma forma Araújo (2010), testando óleos de aroeira frutos, capim cidreira, capim limão e citronela, em sistema *in vitro*, com dieta com alto teor de concentrado não observou diferença na concentração total de AGCC. Alguns autores, no entanto, observaram aumento na concentração total de AGCC (CASTILEJOS et al., 2005; WANG et al., 2009; MEALE et al., 2010; KHOLIF et al., 2012).

Tabela 5 - Efeitos dos dias de coleta durante o experimento sobre a proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal e pH ruminal dos ovinos alimentados com dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis	Dias de coleta			EPM ¹	Valor de P
	7	14	23		
Acetato	51,7 ^b	52,2 ^{ab}	56,0 ^a	1,34	0,01
Propionato	33,4 ^a	33,5 ^a	27,1 ^b	1,96	0,01
Valerato	1,51 ^a	1,42 ^a	1,26 ^b	0,07	0,02
C ₂ :C ₃ ¹	1,82 ^b	1,84 ^{ab}	2,25 ^a	0,16	0,05
N-amoniacal	18,3 ^b	21,6 ^a	23,13 ^a	1,19	<0,01

¹C₂:C₃ = relação acetato:propionato; ^{a,b,c}Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); ¹Erro padrão da média

Também não houve efeito da adição de óleo essencial de tomilho nas concentrações ruminais de nitrogênio amoniacal. Porém, houve efeito do dia de colheita ($P < 0,05$; Tabela 5), sugerindo que o tomilho, igualmente à monensina, foi capaz de inibir a deaminação nos primeiros dias, no entanto, os microrganismos podem ter adaptado. Borchers (1965) observou que a adição de timol (composto ativo de tomilho e orégano no fluido de rúmen *in vitro*), resultou em acúmulo de aminoácidos e redução das concentrações de nitrogênio amoniacal, sugerindo que o timol inibe a deaminação. Alguns estudos demonstram que timol tem amplo espectro de atividade antimicrobiana, inibindo as bactérias gram-positivas e gram-negativas, devido sua capacidade de atuar como agente permeabilizante de membrana (HELANDER et al., 1998; DORMAN; DEANS, 2000; WALSH et al., 2003).

Mcintosh et al. (2003) observaram que uma mistura de compostos de óleos essenciais, que contém timol, reduziu a taxa de deaminação de aminoácidos e inibiu o crescimento de *Clostridium sticklandii* e *Peptostreptococcus*, bactérias que pertencem ao grupo específico de espécies hiper-produtoras de amônia. Os autores sugeriram que esta mistura reduziu a concentração de nitrogênio amoniacal, inibindo as bactérias hiper-produtoras de amônia, num mecanismo de ação semelhante ao da monensina (RUSSELL et al., 1988).

Uma diminuição na concentração de amônia ruminal pode ser indicativo de aumento da síntese de proteína microbiana, porém, a concentração de amônia ruminal, recomendada para máximo desaparecimento de substrato é de 19 mg/dL de líquido ruminal, não sendo necessário que a concentração de amônia no rúmen sejam altas e constantes ao longo do dia (MEHREZ et al., 1977; VAN DER MERWE et al., 2001; NRC, 2001).

Tabela 6 - Consumo e balanço de nitrogênio nos ovinos alimentados com dietas com alto teor de concentrado contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis	Dietas ¹				EPM ²	Valor de P ³
	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		
N ingerido, g/dia	45,22	44,32	38,50	42,21	1,89	0,12
N fezes, g/dia	7,35	5,68	6,28	7,56	0,92	0,51
N absorvido, g/dia	37,86 ^a	38,64 ^a	32,22 ^b	34,65 ^{ab}	1,49	0,05
N urina, g/dia	7,55	9,60	8,58	8,29	1,04	0,63
N retido, g/dia	30,31	29,04	23,64	26,35	1,78	0,10
% N absorvido	79,34	75,11	73,65	76,08	2,58	0,49
% N retido	66,47	65,74	61,32	62,41	2,64	0,49

¹MON = dieta com adição de monensina sódica; 1,25TO = adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 2,50TO = adição de 2,50 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 3,75TO = adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta. ²EPM = Erro padrão da média. ³Valor de P = médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey (P ≤ 0,05)

O óleo essencial de tomilho foi capaz de manter o pH em valor próximos à monensina (P > 0,05). Juven et al. (1994) relataram que o efeito antimicrobiano do óleo essencial de tomilho aumentou a medida que o pH diminuiu de 6,5 para 5,5. É

provável que no pH mais baixo, o grupo hidroxila pode estar não dissociado, se tornando mais hidrofóbico, permitindo uma interação mais fácil da molécula com a bicamada lipídica da membrana celular. Por isso, é importante para determinar as condições sob as quais esses aditivos são utilizados, de forma a modificar a fermentação ruminal microbiana na direção desejada (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Com relação ao balanço de nitrogênio, houve efeito apenas para N absorvido ($P \leq 0,05$), sendo que o tratamento 2,50TO apresentou o menor valor, quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 6). A absorção da amônia é diretamente proporcional a sua concentração no rúmen e aumenta com o aumento do pH do fluido ruminal (KOZLOSKI, 2011).

3.4 CONCLUSÃO

Levando em consideração que a monensina é um aditivo muito utilizado, amplamente estudado e considerado como um bom melhorador de desempenho. Os resultados do presente estudo mostram que o óleo de tomilho pode ser uma alternativa em substituição ao uso da monensina.

REFERÊNCIAS

ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 64, n. 3, p. 403-412, 2005.

ARAÚJO, R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1141 p.

_____. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.

BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 209-228, 2008.

BENCHAAR, C.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; WANG, Y.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, n. 3, p. 413-419, 2007.

BENCHAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 1, p. 91-96, 2006.

BORCHERS, R. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, n. 4, p. 1033-1038, 1965.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARDOZO, P. W.; KAMEL, C. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2508-2516, 2005.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CANNAS, A. TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; PELL, A. N.; VAN SOEST, P. J. A. Mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 149-169, 2004.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2801-2808, 2006.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active compounds on rumen fermentation and nutrient flow in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2649-2658, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

EVANS, J. D.; MARTIN, S. A.; Effect of thymol on ruminal microorganisms. **Current Microbiology**, v. 41, p. 336-340, 2000.

FANDIÑO, I.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; BLANCH, M. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify to rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 1/4, p. 409-417, 2008.

Kozloski, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Ed. Da UFSM, 2011.

McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J.; BEEVER, D. A.; NEWBOLD, C. J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 5011-5014, 2003.

OJEU. **Regulation (EC) No 1831/2003 of the European parliament and the council of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition**. Official Journal of the European Union, L268, p. 29-43, 2003. Disponível em: <http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:pdf> . Acesso em: 21 jun. 2010.

RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY, C. O.; RATHMACHER, R. P. Efeito da monensina sobre a fermentação ruminal in vitro e in vivo **Journal of Animal Science**, v. 43, p. 657-664, 1976.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, New York: editor, 2002. 119 p.

RUSSELL, J. B.; STROBE, H. J. Efeitos dos aditivos sobre a fermentação ruminal in vitro: uma comparação da monensina e bacitracina, outro antibiótico gram-positiva. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 2, p. 552-558, 1988.

SAS INSTITUTE. **Sas systems for Windows**: Version 9. Cary: SAS, 2002.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminants diets. **Journal Environmental Quality**, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

TEKIPPE, J. A.; TACOMA, R.; HRISTOV, A. N.; LEE, C.; OH, J.; HEYLER, K. S.; KASSIDY, T. W.; VARGA G. A.; BRAVO, D. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7892-7903, 2013

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WALLACE, R. J.; MCEWAN, N. R.; MCINTOSH, F. M.; TEFEREDEGNE, B.; NEWBOLD, C. J. Produtos naturais como manipuladores da fermentação ruminal Asian-Australásia **Journal of Animal Science**, v. 10, p. 1458-1468, 2002.

YANG, W. Z.; AMETAJ, B. N.; BENCHAAAR, C.; BEAUCHEMIN, K. A. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: ruminal and intestinal digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 680-688, 2010.

4 EXPERIMENTO II: TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*THYMUS VULGARIS*) COMO MANIPULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM DIETAS COM ALTO TEOR DE VOLUMOSO.

4.1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo nutricionistas de ruminantes estão interessados na modulação da concorrência entre diferentes populações microbianas, com o objetivo de melhorar a eficiência de uso da energia e da proteína no rúmen. Isto só foi conseguido através da otimização das formulações dietéticas e a utilização de aditivos para a alimentação animal que modificam o ambiente ruminal e aumentam ou inibem as populações microbianas específicas (CALSAMIGLIA et al., 2006).

A monensina é um ionóforo amplamente utilizado na alimentação de ruminantes, e seus efeitos positivos sobre a eficiência alimentar, utilização de energia e nitrogênio são bem conhecidos (PLAIZIER et al., 2000; TEDESCHI et al., 2003). No entanto, devido a questões de saúde pública, em 2006 a União Européia banuiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento (OJEU, 2003), sendo os ionóforos uma das classes proibidas.

Nos últimos anos, a preocupação pública sobre o uso de antibióticos aumentou, inclusive na alimentação animal como promotores de crescimento. A partir de então, intensificou-se a busca por substâncias com propriedades antimicrobianas que pudessem substituir os ionóforos. Neste sentido, pesquisadores têm explorado as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários dos vegetais (CALSAMIGLIA et al., 2007; ARAUJO, 2010). Atividades antimicrobianas, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotzoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004). O eugenol (presente no cravo-da-índia), o timol (presente no tomilho e orégano), o carvacrol (presente no orégano), o cinamaldeído (presente na canela) e a capsaicina (presente nas pimentas) são exemplos de óleos essenciais cujas propriedades antimicrobianas já foram investigadas no ambiente ruminal.

Em estudo realizado por Beauchemin e McGinn (2006), com bovinos de corte, consumindo dieta rica em forragens e utilizando uma mistura de óleos essenciais (1

g/dia de Crina® Ruminantes), as emissões de CH₄ não foram afetadas e a digestibilidade da dieta diminuiu. Porém, com a utilização do mesmo produto comercial em estudo *in vitro*, McIntosh et al. (2003) relataram que o crescimento das bactérias metanogênicas *Methanobrevibacter smithii* foi inibido, mas apenas quando a concentração do produto foi 33 vezes mais elevada do que aqueles alimentados *in vivo* por Beauchemin e McGinn (2006). Entretanto, essa dosagem pode ser impraticável, devido a possíveis efeitos deletérios sobre a digestibilidade da dieta e economicamente inviável.

Como a maioria dos trabalhos até o momento foram realizados em sistemas *in vitro*, mais pesquisas *in vivo* são necessárias, para se determinar os efeitos desses compostos no rúmen e no metabolismo animal. Alguns trabalhos mostram ação dos óleos essenciais, como redução na deaminação, taxa de produção de amônia no rúmen, com isso maior escape de nitrogênio para o intestino, redução na produção de metano, diminuindo perdas energéticas e poluição ambiental, bem como redução no lactato (BORCHERS, 1965; EVANS; MARTIN, 2000; CASTILLEJOS et al., 2006; CALSAMIGLIA et al., 2007; ARAÚJO, 2010).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito que óleo de tomilho exerce na fermentação ruminal e, conseqüentemente, no metabolismo de ovinos alimentados com dietas contendo elevados teores de volumoso, bem como avaliar o consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes e balanço de nitrogênio.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido nas instalações para estudos metabólicos com ovinos do Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), entre os meses de setembro e outubro de 2013.

4.2.2 Animais e instalações experimentais

Foram utilizados 20 ovinos $\frac{1}{2}$ Dorper x $\frac{1}{2}$ Santa Inês, machos castrados com peso médio de $64 \pm 10\text{kg}$ (média $\pm$ desvio padrão) e aproximadamente doze meses de idade, canulados no rúmen. Antes do início do período experimental os animais foram vermifugados (Dectomax[®], Pfizer Animal Health, Exton, PA, EUA) na dosagem de 1 mL/50 kg peso vivo em via subcutânea e alojados em baias individuais providas de comedouros e bebedouros. No período de adaptação, os animais foram mantidos em baias individuais de piso ripado e foram alimentados *ad libitum*, do dia zero ao dia 18 (dezoito) e depois foram levados para gaiolas para ensaios de metabolismo com dimensões de 1,30 x 0,55m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina (Figura 3).

Figura 3 - Animais nas instalações experimentais

Fonte: arquivo pessoal

4.2.3 Período experimental e delineamento

O período experimental teve duração de 28, dos quais 23 dias os animais foram mantidos em baias individuais de piso ripado para adaptação as dietas experimentais e então levados para as gaiolas para ensaios de metabolismo e mantidos por quatro dias para mensuração do CMS, colheita de fezes e urina, e um dia para colheita de conteúdo ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental de

blocos completos casualizados com cinco blocos e quatro tratamentos. Os animais foram blocados de acordo com o peso corporal.

4.2.4 Tratamentos experimentais

Avaliou-se o efeito de aditivos (monensina ou teores de óleo essencial de tomilho) em dietas contendo elevados teores de volumoso para ovinos confinados. Os animais foram alimentados com uma ração base, contendo 80% de volumoso (pré-secado de *tifton*) e 20% de concentrados, formuladas de acordo com as recomendações do SRNS (CANNAS et al., 2004) para atender as exigências de PB para ovinos na fase de terminação e conterem a mesma concentração de proteína bruta.

As dietas experimentais foram as seguintes:

- 1 - Dieta base + 25 mg de monensina sódica por kg de matéria natural: MON.
- 2 – Dieta base + 1,25 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 1,25TO
- 3 - Dieta base + 2,5 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 2,50TO
- 4 - Dieta base + 3,75 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 3,75TO

A proporção dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, %MS e %MN

	Tratamentos ¹			
	MON	1,25TO	2,5TO	3,75TO
Ingredientes				
Pré-secado “ <i>tifton</i> ”	80,00	80,00	80,00	80,00
Milho moído	11,97	11,87	11,50	11,62
Farelo de soja	4,50	4,50	4,50	4,50
Calcário calcítico	1,00	1,00	1,00	1,00
Mistura mineral ²	2,50	2,50	2,50	2,50
Rumensim [®] 100 ³	0,025			
Óleo essencial de tomilho	-	0,125	0,25	0,375
Composição química				
Matéria seca (% da MN)	56,78	56,78	56,78	56,77
Matéria orgânica (% da MS)	87,73	87,73	87,73	87,4
Proteína bruta (% da MS)	13,97	13,99	14,24	14,32
Fibra insolúvel em detergente neutro (% da MS)	60,95	60,74	60,35	60,23
Matéria mineral (% da MS)	12,27	12,27	12,27	12,60
Energia metabolizável, Mcal/kg de MS ⁴	2,09	2,09	2,09	2,09

¹ MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,5TO – adição de 2,5 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ²Composição: 5,5% P; 22% Ca; 3,5% Mg; 2,2% S; 7,0% Na; 500 ppm Fe; 450 ppm Cu; 1550 ppm Zn; 20 ppm Se. ³Rumensin 100 (monensina sódica, Elanco do Brasil, São Paulo). ⁴Estimada usando o *Small Ruminant Nutrition System*, v. 1.8.6 (CANNAS et al., 2004).

4.2.5 Manejo alimentar

O pré-secado de “*tifton*” foi picado grosseiramente utilizando-se um picador moedor (Nogueira[®] DPM – 4, Itapira, Brasil) sem peneira. Para o concentrado, o milho foi moído utilizando-se um picador moedor (Nogueira[®] DPM – 4, Itapira, Brasil) provido de peneira com crivos de 10 mm. Em seguida, foram misturados o farelo de soja, o calcário calcítico, a mistura mineral e, no caso do tratamento MON, a monensina sódica (Rumensin[®] 100, Elanco do Brasil, São Paulo, Brasil) utilizando-se um

misturador horizontal com capacidade para 500 kg (Lucato®, Limeira, Brasil). Por se tratar de quantidade pequena, e para maior controle da quantidade fornecida, os óleos essenciais utilizados nos demais tratamentos foram misturados diariamente na dieta de cada animal momentos antes do fornecimento. O cálculo da quantidade de óleo utilizado era realizado diariamente em função da quantidade ofertada (Figura 4).

Como a quantidade de concentrado era pequena e pela dificuldade de homogeneização com o feno, a mistura foi realizada diariamente por animal diretamente no cocho de alimentação.

Durante todos os dias do período experimental, as rações foram pesadas em balança eletrônica (Marte, AC 10K, São Paulo, Brasil) de precisão e ofertadas *ad libitum* duas vezes ao dia às 7:00 horas da manhã e às 19 horas. No dia seguinte, às 7:00 horas da manhã, as sobras de ração ofertada no dia anterior foram pesadas para obtenção do CMS por animal e retornadas para o animal, a qual foi computada para quantificar a oferta para o dia seguinte. A oferta diária era ajustada visando manter as sobras entre 5% e 10% da quantidade ofertada no dia anterior. Os animais tiveram acesso *ad libitum* a água fresca durante todo o experimento.

Figura 4 - Pesagem da dieta experimental

Fonte: arquivo pessoal

4.2.6 Colheita de amostras de conteúdo ruminal para análise de N- amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

No dia zero (dia anterior ao início do fornecimento das dietas experimentais), 7, 14, 21 e 28 do período experimental amostras de conteúdo ruminal foram coletadas manualmente, às 0, 3, 6, 9 e 12 horas após o fornecimento matinal das rações. Logo após a colheita, as amostras foram filtradas em tecido de nylon de 150 micras, sendo em seguida realizada a leitura do pH utilizando-se potenciômetro digital (DIGIMED® DM20; Figura 2). Desse fluido filtrado foram retiradas 2 alíquotas de 25 mL, que foram imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C para posterior determinação da concentração de AGCC e N-amoniacal. Para as análises de AGCC e N-amoniacal, as amostras colhidas nas diferentes horas de cada dia, foram compostas para representarem o dia.

4.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Após o período de adaptação, no dia 23, os animais foram pesados e alocados nas gaiolas para ensaio metabólicos, para avaliação do consumo, digestibilidade e parâmetros ruminais. Nos dias 24, 25, 26 e 27 do período experimental as 7:00 horas da manhã a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foram mensurados (Figura 5). As sobras e as fezes foram pesadas em balança eletrônica (Marte AC 10K, São Paulo, Brasil) de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, foram colhidas amostras (10%) da produção fecal e de urina diária e imediatamente congeladas a -20 °C. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos colhedores das gaiolas em recipientes contendo ácido clorídrico à 50%, sendo o volume de ácido suficiente para manter o pH da urina abaixo de 3.

Nos mesmos dias em que foram colhidas amostras de fezes e urina, foi mensurado o consumo da dieta e colhidas amostras das rações ofertadas. E no dia 22 foi colhido 10% das sobras.

Amostras da ração ofertada, das fezes e da urina foram compostas por animal e conservadas a -20°C para posteriores análises.

Todos os animais foram pesados, no dia zero, dia 23 (vinte e três) e no último dia do período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

Figura 5 - Colheita de fezes e urina

Fonte: arquivo pessoal

4.2.8 Análises laboratoriais e cálculos

4.2.8.1 Ração oferta, sobras, fezes e urina

Depois de descongeladas, as amostras das sobras e das fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55°C por 72 horas. Em seguida todas as amostras, incluindo rações ofertadas, foram moídas em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba, Brasil) com peneiras com crivos de 1,0 mm. O teor de matéria seca (MS) final das amostras foi determinado por meio da secagem em estufa a 105°C por 24 h. A matéria mineral (MM) foi obtida por meio da incineração da amostra em mufla a 550°C por 4 h (AOAC, 1990). A concentração de N total foi determinada através da combustão da amostra utilizando um aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a AOAC (1997). A concentração de FDN foi determinada conforme Van Soest; Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom A2000 (Ankom Tech. Corp., Macedon, NY). O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado pelo método Microkjeldahl (AOAC, 1997).

4.2.8.2 AGCC e N – Amoniacal

Para determinação dos AGCC; 1,6 mL de fluido ruminal adicionado de 0,4 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% e 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) foram centrifugados (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, 1,2 mL de cada amostra foi transferido para *vials* cromatográficos. Do extrato obtido, foi injetado 1 µL em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies) equipado com coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25 m; 0,320 mm; 0,50 µm; J&W 18 Agilent Technologies). A injeção foi realizada de maneira automática; o gás de arraste foi o H₂, mantido em um fluxo de 31,35 mL/min. A temperatura do injetor e detector foi de 260 °C. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 16,5 minutos (min.) dividido em três rampas de aquecimento, como segue: 80 °C (1 min), 120 °C (20 °C/min; 3 min), 205 °C (10 °C/min; 2 min). A concentração dos AGCC (mM) foi determinada com base em uma curva de calibração externa.

A concentração de N-amoniaco foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (Eon, Biotek instruments, Winooski, USA), utilizando-se filtro para absorvância de 550 nm.

4.2.8.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento MIXED do SAS (2002), considerando efeito significativo quando $P < 0,05$ e tendência para $P < 0,10$. Todos os dados foram avaliados quanto a normalidade dos resíduos (teste de Shapiro Wilk), retirada de outliers (observações que apresentaram valores de resíduo estudentizado < -3 ou $> +3$) e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). O conjunto de dados que não respeitou tais premissas foi submetido às transformações logarítmicas, inversa ou raiz quadrada.

Os dados relacionados à fermentação ruminal foram analisados como medidas repetidas no tempo. O modelo estatístico empregado foi: $Y_{ijklr} = \mu + T_j + B_k + C_v + E_{ijkv} + D_r + (TD)_{jr} + (BD)_{kr} + E_{ijkvr}$, onde μ = média geral; T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 4); B_k = efeito de bloco ($k = 1$ a 5); C_v = efeito da covariável; E_{ijkv} = erro residual A; D_r = efeito de Dia ($r = 7, 14, 21$ e 28); $(TD)_{jr}$ = efeito da interação tratamento x dia;

(BD)_{kr} = efeito da interação entre bloco x dia, e E_{ijkvr} = erro residual B. Blocos e interação bloco x dia foram incluídos como efeitos aleatórios. As análises realizadas no material colhido no dia zero (dia anterior ao fornecimento das dietas) foi utilizado como covariável. As matrizes de covariância “compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, autoregressive, heterogeneous autoregressive, unstructured, banded, variance components, toeplitz e heterogeneous toeplitz” foram testadas e definidas de acordo com o menor valor obtido para “Akaike’s Information Criterion” (AIC). As médias dos tratamentos foram obtidas através do comando LSMEANS. Os efeitos de tratamento, dia e interação tratamento x dia foram definidos pelo teste F da análise de variância, quando significativa ($P < 0,05$), desdobrada por comparação de médias usando a opção PDIFF do SAS. Em caso de efeito de tratamento, o conjunto de dados foi submetido ao teste de Tukey.

Os dados de digestibilidade aparente dos nutrientes foram analisados através do modelo: $Y_{ijk} = \mu + T_j + B_k + E_{ijk}$, onde μ = média geral; T_j = efeito de tratamento ($j = 1$ a 4); B_k = efeito de bloco ($k = 1$ a 5), e E_{ijk} = erro residual. O bloco foi incluído como efeito aleatório. As médias dos tratamentos foram obtidas através do comando LSMEANS. O efeito de tratamento foi definido de acordo com o teste F da análise de variância e em caso de significância, o conjunto de dados foi submetido ao teste de Tukey.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal médio (PC) dos animais ao longo do período experimental foi: 66,7; 64,8; 63,7; 65,8 para os tratamentos MON, 1,25TO, 2,50TO e 3,75TO, respectivamente.

Não houve efeito dos tratamentos sobre o consumo de MS, MO, FDN e PB (Tabela 8). Da mesma maneira, não houve diferença na digestibilidade dos nutrientes. Segundo Anassori et al. (2011) o efeito da monensina na digestibilidade pode ser diferente, em que, à monensina diminui a degradabilidade da MO. No entanto, com o maior tempo de adaptação dos estudos *in vivo*, as bactérias celulolíticas resistentes a monensina podem eventualmente substituir as não resistentes, evitando a diminuição da degradação das fibras (SCHELLING, 1984).

Em trabalho realizado por Tekipe et al. (2013), testando alguns compostos de óleos essenciais (eugenol e cimaldeído), não foram observados efeitos sobre o consumo e digestibilidade da maioria dos nutrientes. De maneira similar (BENCHAAAR et al. 2007; BENCHAAAR, 2008), não foi verificado diferença no consumo de matéria seca e digestibilidade dos nutrientes. No entanto, Yang et al. (2007), trabalhando com óleo essencial de zimbro, na dose de 2 g/dia, com vacas leiteiras, observaram aumento de 13% na digestibilidade da matéria seca em dietas com 40% de volumoso e 60% de concentrado, no entanto, a digestibilidade da matéria orgânica, fibra e amido não foram afetadas pelos tratamentos. Fica claro, que a necessidade de mais estudo sobre o assunto ainda é grande.

Tabela 8 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes pelos ovinos alimentados com as dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis ⁴	Dietas ¹				EPM ²	Valor de P ³
	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		
Consumo (kg/dia)						
MS	1,04	1,11	0,95	1,02	0,06	0,42
MO	0,91	0,98	0,83	0,89	0,05	0,42
FDN	0,63	0,68	0,57	0,61	0,04	0,38
PB	0,15	0,16	0,14	0,15	0,01	0,52
Digestibilidade, %						
MS	51,9	53,4	52,7	51,0	2,10	0,89
MO	53,3	54,0	53,6	52,0	2,20	0,94
FDN	50,7	50,9	50,8	48,3	2,65	0,90
PB	68,9	68,9	66,9	66,8	1,24	0,47

¹MON = dieta com adição de monensina sódica; 1,25TO = adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 2,50TO = adição de 2,50 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 3,75TO = adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta. ²EPM = Erro padrão da média. ³Valor de P = médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste ($P \leq 0,05$). ⁴MS = matéria seca; FDN = fibra em detergente neutro; PB = proteína bruta; MO = matéria orgânica; MM = matéria mineral.

Com relação aos AGCC, a proporção de acetato não foi afetada ($P > 0,05$) pela inclusão de óleos essenciais de tomilho na dieta, o que pode ser visto de maneira

positiva, visto que a monensina é tida como um aditivo que melhora o desempenho e fermentação ruminal. Também não houve influência do dia de colheita (Tabela 9).

Maiores concentrações de propionato estão associadas a melhoria na eficiência de utilização de energia. Segundo Russel e Strobel (1988), monensina aumenta a produção de propionato. E de acordo com a estequiometria da produção de gases, a formação de propionato está associada com decréscimos nas produções de gás e CH_4 (WOLIN, 1960). Ao se produzir propionato não há produção de H^+ como observado nas rotas que levam à produção de acetato e butirato. As vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H^+ (VAN SOEST, 1994; RUSSELL, 2002).

Com relação ao propionato, os tratamentos MON e 1,25TO apresentaram maiores concentrações, quando comparado ao tratamento 2,50TO, porém não diferiu do tratamento 3,75TO ($P < 0,05$). Como houve diferença nas concentrações de propionato para os tratamentos MON e 1,25TO e não houve alterações nas concentrações de acetato, isso acarretou um menor valor da relação acetato:propionato para os tratamentos MON e 1,25TO ($P < 0,05$), sendo que, os tratamentos 2,50TO e 3,75TO, apresentaram valores maiores ($P < 0,05$; Tabela 9). Esse resultado pode ser visto de forma positiva, demonstrando que 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS, tem o mesmo efeito que a monensina, para as variáveis propionato e, conseqüentemente, para relação $\text{C}_2:\text{C}_3$.

Segundo Araújo (2010), a ausência de efeito sobre a concentração total de AGCC pode ser vista de forma positiva, desde que acompanhada por alterações na proporção molar dos AGCC (menor relação acetato:propionato, decréscimos na produção de CH_4 e concentração de N-amoniaco). Esse mesmo autor encontrou aumento na concentração de propionato apenas para monensina ($P < 0,05$), sendo que alguns óleos apresentaram redução ($P < 0,05$) para esta mesma variável.

Devant et al. (2007), testando uma mistura comercial de óleos essenciais de plantas (Biostar®), observaram aumento na concentração de propionato e redução na relação $\text{C}_2:\text{C}_3$. Segundo Calsamiglia et al. (2007), doses moderadas de timol (100 a 400 mg/L; principal princípio ativo do tomilho e orégano) resultou em aumento na proporção de $\text{C}_2:\text{C}_3$. Já Castillejos et al. (2006) relataram que doses baixas de timol (50 mg/L) não surtiu efeito na fermentação ruminal *in vitro*, mas em doses elevadas (500 mg/L) reduziu as concentrações de AGCC totais e aumentou a relação $\text{C}_2:\text{C}_3$.

Alguns óleos essenciais são semelhantes aos ionóforos, pela capacidade de atuar sobre as populações microbianas no rúmen, altera o padrão fermentativo, reduz a relação $C_2:C_3$ e a produção de metano, fazendo com que o rúmen se torne energeticamente mais eficiente (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Houve interação entre tratamento e dia de colheita para as variáveis isobutirato, butirato, isovalerato e concentração total de AGCC ($P < 0,05$). Realizando o desdobramento das interações, para a variável isobutirato houve efeito apenas no dia sete, sendo que o tratamento 2,50TO obteve o maior valor (Figura 6). No entanto, é possível observar uma variação muito grande no tratamento 2,50TO, do dia sete para o dia quatorze. Essa variação indica que pode ter havido uma redução na deaminação de valina, mas após o décimo quarto dia ocorre uma adaptação dos microrganismos.

Araújo, (2010) observou que apenas o tratamento com aroeira frutos 150 μL reduziu ($P < 0,05$) a concentração de isobutirato para alta forragem. No entanto, observou redução na concentração desse mesmo isoácido ($P < 0,05$) com o tratamento monensina, para os ensaios com erva-baleire e copaíbas.

Tabela 9 - Proporção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal e pH ruminal dos ovinos alimentados com dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis	Dieta ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		Dieta	Dia	Dieta*Dia
AGCC, mM/100mM								
Acetato	72,2	71,0	72,6	73,4	0,53	0,14	0,93	0,41
Propionato	15,5 ^a	15,6 ^a	14,5 ^b	14,7 ^{ab}	0,28	0,05	0,07	0,08
Isobutirato	1,10	1,12	1,19	1,10	0,06	0,68	0,01	0,05
Butirato	8,13	9,48	8,46	8,15	0,32	0,07	<0,01	<0,01
Isovalerato	1,50	1,42	1,42	1,30	0,10	0,57	<0,01	0,04
Valerato	0,69	0,77	0,81	0,77	0,03	0,07	0,27	0,83
C ₂ :C ₃ ⁴	4,61 ^b	4,58 ^b	5,04 ^a	5,01 ^a	0,12	0,04	0,16	0,09
AGCC Total ⁵	91,2	87,3	93,8	97,1	2,70	0,18	<0,01	<0,01
N-amoniacoal, mg/dL	9,12	8,48	10,02	9,73	1,20	0,82	0,07	0,96
pH	6,50 ^{bc}	6,63 ^a	6,57 ^{ab}	6,44 ^c	0,04	0,02	<0,01	0,11

¹MON = dieta com adição de monossódio de ácido 4-oxopentanoico

¹MON = dieta com adição de monensina sódica; 1,25TO = adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 2,50TO = adição de 2,50 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 3,75TO = adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta.

²EPM = Erro padrão da média. ³Dieta = efeito de dieta; Dia = efeito de dia de colheita; Dieta x Dia = Efeito da interação entre dieta e dia. ⁴C₂:C₃ = relação acetato:propionato. ⁵ AGCC total = ácidos graxos de cadeia curta total

Para a variável isovalerato, não houve efeito dos tratamentos no dia sete. Contudo, no dia 14 o tratamento MON obteve o maior valor, diferindo dos tratamentos 2,50TO e 3,75TO, enquanto o tratamento 1,25TO não diferiu dos demais. Da mesma maneira, no dia 21 o tratamento MON foi o que obteve a maior proporção, que foi maior, estatisticamente, apenas ao tratamento 3,75TO. No dia 28 o que apresentou a maior proporção foi 1,25TO, com proporções semelhantes aos tratamentos MON e 2,50TO, e maior que 3,75TO (Figura 7).

Apesar da ausência de efeitos no dia sete para a proporção de isovalerato, uma redução muito acentuada é observada nos tratamentos 2,50TO e 3,75TO (Figura 7). Isso pode indicar uma redução na deaminação de leucina, que tem um persistência maior para o tratamento 3,75TO, onde ocorre um pequeno aumento após o dia 21, e para o tratamento 2,50TO esse aumento é observado a partir do dia 14, o que pode indicar uma adaptação dos microrganismos após esse período.

Borchers (1965) foi o primeiro a relatar que a incubação *in vitro* de caseína no fluido ruminal com timol (principal componente ativo do óleo de tomilho) resultou numa acumulação de AA e uma redução na concentração de nitrogênio amoniacal, o que sugere que a deaminação foi inibida. O isobutirato e isovalerato é produzido pela deaminação de valina e leucina, respectivamente (RUSSEL, 2002). Alguns óleos atuam sobre a redução da deaminação, não afetando proteólise nem peptidólise (WALLACE, 2004).

Figura 6 - Proporção molar de isobutirato em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou óleo essencial de tomilho

MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,50TO – adição de 2,5 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ^{a,b,c}Letras diferentes no mesmo dia diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Como houve diferenças opostas das variáveis isobutirato e isovalerato, nas dietas com óleo essencial de tomilho quando comparado a monensina. O efeito do óleo sobre a deaminação, não fica evidente, já que não houve diferença para N-amoniacal.

Com relação ao butirato, houve efeito em todos dos dias de colheita, sendo que no dia sete o tratamento 1,25TO apresentou a maior proporção e diferiu dos demais. Houve diferença também entre os tratamentos 2,50TO e MON e esses não diferiram do tratamento 3,75TO. No dia 14 os tratamentos 1,25TO e MON apresentaram as maiores proporções, diferindo somente do tratamento 2,50TO, que não apresentou diferença em relação ao 3,75TO (Figura 8).

Ainda em relação ao butirato, no dia 21 o tratamento 2,50TO foi quem obteve o maior valor, e o menor valor obtido foi para o tratamento MON. Não houve diferença entre os tratamentos 1,25TO e 3,75TO, e estes com os demais. No entanto, para o dia 28 o tratamento que apresentou maior valor foi 1,25TO, mas diferiu apenas do tratamento 3,75TO, enquanto os tratamentos MON e 2,50TO não diferiram dos demais (Figura 8).

Figura 7 - Proporção molar de isovalerato em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou óleo essencial de tomilho

MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,50TO – adição de 2,5 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ^{a,b,c}Letras diferentes no mesmo dia diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Os resultados encontrados para a variável butirato (Figura 7), não deixa claro um efeito dos aditivos sobre os microrganismos produtores desse AGCC. Vale lembrar que, muitas espécies o fazem, mas existem algumas espécies bacterianas ruminais que são especialmente produtoras de butirato, a exemplo *Butyrivibrio fibrisolvens*.

Hristov et al. (2013) ao testar óleo essencial de orégano, com vacas holandesas primíparas, observaram redução na concentração de butirato para os grupos que foram tratados com óleo de orégano.

Figura 8 - Proporção molar de butirato em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica e óleo essencial de tomilho

MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,5TO – adição de 2,5 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ^{a,b,c}Letras diferentes no mesmo dia diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

O butirato é o ácido graxo de cadeia curta com maior capacidade para estimular o desenvolvimento da mucosa ruminal, inibindo a apoptose das células da mucosa (MENTSCHER et al., 2001). Óleos essenciais de cinamaldeído, alho, anis e orégano afetaram a concentração de butirato entre os dias dois e seis de fermentação, deixando de existir diferença após o dia seis, mostrando que estes aditivos possuem efeito a curto prazo e que a adaptação ocorreu após o sexto dia (CARDOZO et al., 2004).

Com relação ao valerato, houve uma tendência de aumento ($P = 0,07$) para a dieta contendo 2,5 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS e não houve efeito para o dia de colheita. Em experimento com óleo de canela, Fraser et al. (2007) relataram que houve interação tratamento x dia de amostragem para variável valerato. Reportaram que a proporção molar foi semelhante entre os tratamentos no dia nove, aumentou com a adição de óleo de canela do dia 10 a 13 e não diferiu entre os tratamentos do dia 14 até o fim do experimento.

Araújo (2010), incubando forragem, não observou alteração na concentração de valerato para nenhum dos ensaios. E incubando dieta com alto teor de concentrado houve decréscimo na concentração de valerato somente no ensaio de copaíbas.

Enquanto Castillejos et al. (2008) observaram aumento de valerato ao incubarem dieta com alto teor de concentrado com 10mg/L de monensina.

A concentração total de AGCC no dia sete foi maior para o tratamento 3,75TO, contudo semelhante ao tratamento MON, sendo a menor concentração encontrada no tratamento 2,50TO que não diferiu do 1,25TO. E os tratamentos MON e 1,25TO foram semelhantes entre si. No dia 14 o tratamento 2,50TO obteve o maior valor, que no caso foi estatisticamente igual ao 3,75TO, sendo que este não diferiu dos demais (Figura 9). O aumento observado do dia sete para o dia 14, no tratamento 2,50TO, é um indicativo, de que, nesta dose o óleo de tomilho não foi capaz de inibir o metabolismo microbiano

Ainda sobre a concentração total de AGCC, no dia 21 não houve diferença entre os tratamentos. E no dia 28 os tratamentos 3,75TO, 2,50TO e MON foram os que apresentaram as maiores concentrações totais de AGCC, tendo o tratamento 1,25TO o menor valor (Figura 11). No dia 28, as concentrações não são maiores, apenas que no tratamento 1,25TO, elas mostram um aumento com o passar do tempo, quando comparadas ao dia sete. Esse aumento observado com o decorrer do tempo indica uma possível adaptação dos microrganismos ruminais, sendo que, o tratamento 1,25TO foi o único capaz de reduzir essa concentração após o dia 21.

Para ovelhas em lactação alimentadas com uma mistura de timol, eugenol, guaiacol, limoneno e vanilina (Crina Ruminantis®; 0, 50, 100, 150 mg/kg de concentrado) houve tendência em aumentar a concentração total de AGCC de 115,2 para 126,2 mM (GIANNENAS et al. 2011). Benchaar et al. (2006), suplementando vacas com Crina Ruminantis®, não obtiveram nenhum efeito sobre as concentrações de AGV totais, assim como também não houve efeito da monensina.

Evans e Martin (2000) relataram que o timol afetou o metabolismo de duas relevantes bactérias ruminais, cultivadas em cultura pura: *Streptococcus bovis* e *Selenomonas ruminantium*. Em doses mais elevadas, reduziu a produção total de ácidos graxos voláteis, uma indicação clara que o metabolismo microbiano foi inibida. Este efeito foi atribuído à perda de integridade de membrana celular e uma redução na absorção de glicose. No presente estudo, nem sempre as doses mais elevadas foram as que obtiveram a menor concentração total de AGCC.

Figura 9 - Concentração total de AGCC em ovinos ao longo dos dias recebendo dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica e óleo essencial de tomilho

MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,50TO – adição de 2,5 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 g de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ^{a,b,c}Letras diferentes no mesmo dia diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Para a variável nitrogênio amoniacal, os tratamentos monensina e óleos essenciais apresentaram valores semelhantes ($P > 0,05$). Porém, houve tendência de efeito para o dia de colheita ($P = 0,07$; Tabela 9). O que nos sugere que pode ter havido uma adaptação dos microrganismos ao óleo essencial. Borchers (1965) foi o primeiro a relatar que a incubação *in vitro* de caseína no fluido ruminal com timol (1.000 mg/l) resultou numa acumulação de AA e uma redução da concentração de N-amoniacoal, sugerindo que a deaminação foi inibida.

Com relação ao pH, houve efeito de dieta, sendo que o tratamento 1,25TO obteve o maior valor, mas não diferiu do 2,50TO ($P < 0,05$). O tratamento MON foi semelhante ao 2,50TO e 3,75TO ($P < 0,05$), e o menor valor encontrado foi no tratamento 3,75TO. O pH também sofreu efeito de dia de colheita ($p < 0,01$) com médias de 6,60; 6,47; 6,46 e $6,60 \pm 0,03$, para os dias 7; 14; 21 e 28, respectivamente.

Alguns estudos *in vitro* sugeriram que os efeitos do timol são dependentes da dieta e do pH (CARDOSO et al., 2005; CASTILLEJOS et al., 2006). Embora Castillejos et al. (2006) relataram que o timol aumentou a relação acetato:propionato em dieta contendo 60% de alfafa e 40% de concentrado a pH elevado (6,40). O presente estudo

também apresentou dados semelhantes no tratamento 3,75TO em que o pH foi de 6,44 e a relação acetato:propionato foi maior (Tabela 8).

Tabela 10 - Consumo e balanço de nitrogênio nos ovinos alimentados com dietas com alto teor de volumoso contendo monensina sódica ou teores de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Variáveis	Dietas ¹				EPM ²	Valor de P ³
	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		
N ingerido, g/dia	23,17	24,86	21,65	23,25	1,35	0,52
N fezes, g/dia	7,23	7,64	7,51	7,85	0,67	0,91
N absorvido, g/dia	15,93	17,11	15,12	15,73	1,02	0,61
N urina, g/dia	8,72 ^a	4,35 ^b	4,70 ^b	3,62 ^b	1,24	0,04
N retido, g/dia	7,21 ^b	12,76 ^a	10,41 ^{ab}	12,11 ^a	1,19	0,02
% N absorvido	43,63 ^b	75,47 ^a	70,94 ^a	78,53 ^a	7,85	0,02
% N retido	30,03 ^b	51,80 ^a	47,50 ^a	52,61 ^a	5,13	0,02

¹MON = dieta com adição de monensina sódica; 1,25TO = adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 2,50TO = adição de 2,50 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta; 3,75TO = adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta. ²EPM = Erro padrão da média. ³Valor de P = médias com letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey (P ≤ 0,05)

Com relação ao balanço de nitrogênio, não houve efeito para as variáveis N ingerido, N fezes e N absorvido. No entanto, houve efeito para N urina, sendo que o tratamento MON obteve o maior valor. Dessa forma, também houve efeito sobre as variáveis N retido, %N absorvido e %N retido, sendo que nessas o tratamento MON apresentou o menor valor. Apenas para a variável N retido o tratamento 2,50TO não diferiu dos demais (Tabela 9).

Como não houve diferença para N ingerido, N fezes e N absorvido, uma possível explicação para a diferença encontrada nas demais variáveis é que o óleo essencial de tomilho foi mais eficiente em reduzir a deaminação do que a monensina. Pois, a maior concentração de nitrogênio na urina é reflexo de maior quantidade de nitrogênio chegando ao fígado e tendo que ser excretado. Outra possibilidade seria o aumento da síntese proteica. Além disso, a absorção de amônia é diretamente proporcional à sua concentração no rúmen e aumenta com o aumento do pH, em que, a amônia que não é incorporada nos compostos nitrogenados microbianos é, em grande parte, absorvida pelo epitélio ruminal (KOZLOSKI, 2011).

4.4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de tomilho pode ser uma alternativa em substituição ao uso da monensina. Visto que, na dose de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS não prejudicou o consumo e digestibilidade de MS, MO, FDN e PB, a produção de propionato e a relação acetato:propionato, e ainda foi capaz de diminuir a excreção de N urina (g/dia) e aumentar o N retido (g/dia) quando comparado a monensina

REFERÊNCIAS

ANASSORI, E.; DALIR-NAGHADEH, B.; PIRMOHAMMADI, R.; TAGHIZADEH, A.; ASR-REZAEI, S.; MAHAM, M.; FARAHMAND-AZAR, S.; FARHOOMAND, P. Garlic: a potential alternative for monensin as a rumen modifier. **Livestock Science**, v. 142, p. 276-287, 2011.

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg, 1997. 1141p.

_____. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 209-228, 2008.

BENCHAAAR, C.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; WANG, Y.; BEAUCHEMIN, K. A.; McALLISTER, T. A. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 87, n. 3, p. 413-419, 2007.

BENCHAAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 1, p. 91-96, 2006.

BORCHERS, R. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 24, n. 4, p. 1033-1038, 1965.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223- 253, 2004.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CANNAS, A. TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; PELL, A. N.; VAN SOEST, P. J. A. Mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 149-169, 2004.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 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**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 11, p. 3230-3236, 2004.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; MARTÍN-TERESO, J.; TER WIJLEN, H. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 259-270, 2008.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active compounds on rumen fermentation and nutrient flow in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 7, p. 2649-2658, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DEVANT, M.; ANGLADA, A.; BACH, A. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, n. 1/2, p. 46- 57, 2007.

EVANS, J. D.; MARTIN, S. A. Effect of thymol on ruminal microorganisms. **Current Microbiology**, v. 41, p. 336-340, 2000.

FRASER, G. R.; CHAVES, A. V.; WANG, Y.; McALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; BENCHAAAR, C. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2315-2328, 2007.

GIANENNAS, I.; SKOUFOS, J.; GIANNAKOPOULOS, C.; WIEMANN, M.; GORTZI, O.; LALAS, S.; KYRIRIAZAKIS, I. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 123-130, 2011.

HRISTOV, A. N.; LEE, C.; CASSIDY, T.; HEYLER, K.; TEKIPPE, J. A.; VARGA, G. A.; CORL, B.; BRANDT, R. C. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1189-1202, 2013.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2011.

McINTOSH, F. M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R. J.; BEEVER, D. A.; NEWBOLD, C. J. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their

protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 8, p. 5011-5014, 2003.

MENTSCHER, J.; LEISER, R.; MULLING, C.; PFARRER, C.; CLAUS, R. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. **Archiv für Tierernährung**, Berlin, v. 55, p. 85–102, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC). **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D. C: National Academy Press, 2007. 384 p.

OJEU. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European parliament and the council of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L268, p. 29-43, 2003. Disponível em: <http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:pdf>. Acesso em: 21 jun. 2010.

PLAIZIER, J. C.; MARTIN, A.; DUFFIELD, T.; BAGG, R.; DICK, P.; MCBRIDE, B. W. Efeito da administração do pré-parto de monensina em uma cápsula de liberação controlada na digestibilidade aparente e utilização do nitrogênio em produtos lácteos transição vacas. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2918-2925, 2000.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca; 2002. p. 119.

SAS INSTITUTE. **Sas systems for Windows: Version 9**. Cary: SAS, 2002.

SCHELLING, G. T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 61, p. 1518–1527, 1984

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminants diets. **Journal Environmental Quality**, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

TEKIPPE, J. A.; TACOMA, R.; HRISTOV, A. N.; LEE, C.; OH, J.; HEYLER, K. S.; KASSIDY, T. W.; VARGA G. A.; BRAVO, D. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 7892-7903, 2013.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 63, n. 4, p. 621-629, 2004.

YANG, W. Z.; AMETAJ, B. N.; BENCHAAR, C.; BEAUCHEMIN, K. A. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: ruminal and intestinal digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 680-688, 2010.

5 EXPERIMENTO III: TEORES DE ÓLEO ESSENCIAL DE TOMILHO (*Thymus vulgaris*) NO DESEMPENHO DE BORREGAS ½ DORPER X ½ SANTA INÊS ALIMENTADAS COM DIETAS DE ALTO TEOR DE VOLUMOSO.

5.1 INTRODUÇÃO

Informações sobre o desempenho de ruminantes recebendo óleos essenciais ainda são escassos na literatura, em parte devido às pesquisas terem se iniciado apenas nesta última década. Parte dos resultados negativos encontrados em trabalhos *in vivo* pode ser atribuída ao desconhecimento das melhores doses, da forma adequada de fornecimento e das interações com a dieta e com o ambiente ruminal.

Já se constatou redução no CMS ao se utilizar óleos essenciais com o objetivo de manipular a fermentação ruminal. O fornecimento de 180 mg/d de cinamaldeído + 90 mg/d de eugenol reduziu em 16% o CMS e em 14% a ingestão de água por novilhas de corte (CARDOZO et al., 2006).

Estes resultados indicam que óleos essenciais podem estar relacionados a problemas de aceitabilidade, o que dependerá do tipo de óleo e da quantidade fornecida. Óleos essenciais possuem, em sua grande maioria, cheiro e sabor bastante acentuados. Muitas vezes, as doses necessárias *in vivo* podem causar efeito negativo sobre o consumo animal. Os efeitos dose-dependentes foram claramente demonstrados ao se fornecer 0, 400, 800 e 1600 mg/d de cinamaldeído para novilhas, constatando-se efeito quadrático sobre o CMS (YANG et al., 2010). Logo, a definição da quantidade adequada a ser fornecida é fator importante para o sucesso do uso de óleos essenciais.

Meyer et al. (2009) observaram resultados promissores com o produto comercial Crina Ruminants®, verificando mesma eficiência alimentar para o grupo recebendo o produto + Tilosina (0,153) e o grupo Monensina + tilosina (0,156), sendo ambos superiores ao grupo controle (0,145).

Novilhos recebendo outra mistura de óleos essenciais (Vertan®; timol, eugenol, vanilina e limoneno) apresentaram eficiência alimentar de 0,145, 0,158, 0,154 e 0,130 para o controle, monensina e 2 ou 4 g/dia do produto, respectivamente (BENCHAAAR et al., 2006). Foi verificado efeito quadrático de óleo sobre a eficiência alimentar, sendo 2 g/d a melhor dose. Logo, dose elevada do produto foi prejudicial ao desempenho.

Resultados positivos com cordeiros confinados também foram obtidos ao usar óleo de zimbro (*Juniperus communis*) ou cinamaldeído (200 mg/kg de MS). O GMD foi 254, 250 e 217 g para o óleo de zimbro, cinamaldeído e controle, respectivamente. Houve também melhora para a conversão alimentar e aumento na concentração ruminal de propionato. Mais uma vez, não houve efeito dessas sobre atributos sensoriais e aceitabilidade da carne, inclusive com mínimo efeito sobre o perfil de ácidos graxos (CHAVES et al., 2008a). Vale ressaltar que monoterpenos e sesquiterpenos podem ser encontrados no tecido adiposo de carneiros, tanto mantidos em confinamento como em pastagens naturais (PRIOLO et al., 2004).

Os objetivos deste estudo foram avaliar teores do óleo essencial de Tomilho (*Thymus vulgaris*) nas dietas sobre o ganho de peso e eficiência alimentar de borregas confinadas com dietas 80:20 (volumoso:concentrado).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido nas instalações para estudos metabólicos com ovinos do Sistema Intensivo de Produção de Ovinos e Caprinos (SIPOC) do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), entre os meses de novembro de 2013 e fevereiro de 2014.

5.2.2 Animais e instalações experimentais

Cinquenta borregas ½ Dorper x ½ Santa Inês, com peso médio inicial de 30 ± 3 kg (média $\pm$ desvio padrão) e aproximadamente 150 dias. Os animais foram alojadas individualmente em baias cobertas (1,35 m x 3,5 m) com piso de concreto, contendo

cocho para fornecimento de ração, cocho para fornecimento de sal e bebedouro (Figura 10).

Os animais foram vacinados contra clostridioses antes da desmama e everminados antes do início do experimento. A ocorrência de coccidiose foi avaliada, através de exames de fezes para contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG) no início do segundo e terceiro período experimental e controladas com Baycox® Ruminantes (Bayer; dosagem de 1mL/3,5kg de peso vivo).

Figura 10 - Vista das baias experimentais

Fonte: arquivo pessoal

5.2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos completos casualizados, com dez blocos e cinco tratamentos. Os blocos foram definidos de acordo com o peso dos animais. O período experimental foi de 84 dias, divididos em três sub-períodos de 28 dias.

5.2.4 Tratamentos experimentais

Avaliou-se o efeito de aditivos (monensina ou teores de óleo essencial de tomilho) em dietas contendo elevados teores de volumoso para ovinos confinados. Os animais

foram alimentados com uma ração base, contendo 80% de volumoso (pré-secado de *tifton*) e 20% de concentrado, formuladas de acordo com as recomendações do SRNS (CANNAS et al., 2004) para atender as exigências de PB para ovinos na fase de crescimento e conterem a mesma concentração de proteína bruta.

A proporção dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 11 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % MS e % MN

	Tratamentos ¹				
	Controle	MON	1,25TO	2,5TO	3,75TO
Ingredientes					
Pré secado “ <i>tifton</i> ”	80,0	80,0	80,0	80,0	80,0
Milho moído	12,0	12,0	11,9	11,8	11,6
Farelo de soja	4,50	4,50	4,50	4,50	4,50
Calcário calcítico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mistura mineral ²	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Rumensim® 100 ³	-	0,025			
Óleo essencial de tomilho	-	-	0,125	0,250	0,375
Composição química					
Matéria seca (% da MN)	65,8	65,8	65,8	65,8	65,8
Matéria orgânica	88,6	88,6	88,6	88,6	88,6
Proteína bruta	13,4	13,9	13,9	14,2	14,3
Fibra insolúvel em detergente neutro	60,7	60,9	60,7	60,3	60,2
Matéria Mineral	11,3	11,3	11,3	11,3	11,3
Energia metabolizável, Mcal/kg de MS ⁴	2,1	2,1	2,1	2,1	2,1

¹Controle = dieta base; MON= adição de 25 mg de monensina sódica por kg/MS da dieta base; 1,25TO – adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 2,5TO – adição de 2,5 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base; 3,75TO – adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg/MS da dieta base. ²Composição: 5,5% P; 22% Ca; 3,5% Mg; 2,2% S; 7,0% Na; 500 ppm Fe; 450 ppm Cu; 1550 ppm Zn; 20 ppm Se. ³Rumensin 100 (monensina sódica, Elanco do Brasil, São Paulo). ⁴Estimada usando o *Small Ruminant Nutrition System*, v. 1.8.6 (CANNAS et al., 2004).

As dietas experimentais foram as seguintes:

- 1- Dieta base (sem adição de óleo essencial ou monensina): Controle
- 2 - Dieta base + 25 mg de monensina sódica por kg de matéria natural: MON.
- 3 – Ração base + 1,25 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 1,25TO
- 4 - Dieta base + 2,5 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 2,50TO
- 5 - Dieta base + 3,75 mL de óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) por kg/MS: 3,75TO

5.2.5 Manejo alimentar e pesagem

O feno de “*tifton*” foi picado grosseiramente utilizando-se um picador moedor (Nogueira® DPM – 4, Itapira, Brasil) sem peneira. O alimento volumoso foi fornecido três vezes/semana, *ad libitum*. Para o concentrado, o milho foi moído utilizando-se um picador moedor (Nogueira® DPM – 4, Itapira, Brasil) provido de peneira com crivos de 10 mm. Em seguida foram misturados farelo de soja, calcário, mineral e, no caso do tratamento MON, a monensina sódica (Rumensin® 100, Elanco do Brasil, São Paulo, Brasil) utilizando-se um misturador horizontal com capacidade para 500 kg (Lucato®, Limeira, Brasil). Por se tratar de quantidade pequena, e para maior controle da quantidade fornecida, os óleos essenciais utilizados nos demais tratamentos foram misturados diariamente na dieta de cada animal momentos antes do fornecimento. O cálculo da quantidade de óleo utilizado era realizado diariamente em função da quantidade ofertada (Figura 11).

Os animais tiveram acesso *ad libitum* à dieta e água fresca. A quantidade de ração ofertada foi definida com base na leitura de cocho realizada antes do fornecimento. As sobras foram mantidas em aproximadamente 10% da quantidade ofertada e foram novamente ofertadas fazendo parte da oferta do dia.

Uma vez por semana, as sobras de cada unidade experimental foram retiradas, pesadas, amostradas (10%) e compostas por tratamento. A cada partida de ração

uma amostra foi colhida. As amostras foram conservadas a -20 °C para posterior análise.

O GMD (ganho médio diário) dos animais foi acompanhado por meio de pesagens realizadas nos dias 0, 28, 56 e 84 do período experimental após jejum de sólidos de 14 horas.

As amostras das rações ofertadas e das sobras foram moídas em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba, Brasil) com peneiras com crivos de 1,0 mm e analisadas para determinação da matéria seca (MS) por meio da secagem das amostras em estufa a 105°C por 24 h, matéria mineral (MM) através da incineração das amostras em mufla a 550°C por 4 h (AOAC, 1990), nitrogênio total utilizando um aparelho Leco FP528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI), conforme a AOAC (1997), e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) conforme Van Soest; Robertson e Lewis (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom 200 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY).

Figura 11 - Manejo alimentar

Fonte: arquivo pessoal

5.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Procedimento MIXED do SAS (2002) e considerado efeito significativo quando $P < 0,05$ e tendência para $P < 0,10$. Todos os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos (teste de Shapiro Wilk), retirada de outliers e a homogeneidade das variâncias (teste de Levene). O

conjunto de dados que não respeitou tais premissas foi submetido às transformações logarítmicas, inversa ou raiz quadrada.

As variáveis relacionadas ao ganho médio diário, consumo de nutrientes, EA e coccidiose foram analisadas como medidas repetidas (efeito do período) no tempo e empregou-se o seguinte modelo de análise: $Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + P_k + E_{ij} + (BP)_{ik} + (TP)_{jk} + E_{ijk}$, onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 10); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 4); E_{ij} = erro residual A; P_k = efeito de período experimental ($k = 1$ a 2); $(BP)_{ik}$ = interação bloco x período experimental; $(TP)_{jk}$ = interação tratamento x período experimental, e E_{ijk} = erro residual B. Bloco e interação bloco x período foram incluídos como efeitos aleatórios. As matrizes de covariância “compound symmetry, heterogeneous compound symmetry, autoregressive, heterogeneous autoregressive, unstructured, banded, variance components, toeplitz e heterogeneous toeplitz” foram testadas e definidas de acordo com o menor valor obtido para “Akaike’s Information Criterion” (AIC). As médias dos tratamentos foram obtidas pelo comando LSMEANS. O efeito de tratamento, período e interação entre tratamento e período foram definidos de acordo com o teste F da análise de variância quando significativa ($P < 0,05$), desdobrada por comparação de médias usando a opção PDIFF do SAS. Em caso de efeito significativo para tratamento, o conjunto de dados foi submetido ao teste de Tukey.

Para análise estatística do peso dos animais foi utilizado o seguinte modelo: $Y_{ijk} = \mu + B_i + T_j + E_{ij}$, onde μ = média geral; B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 10); T_j = efeito do tratamento ($j = 1$ a 4) e E_{ij} = erro residual. O bloco foi incluído como efeito aleatório. As médias dos tratamentos foram obtidas pelo comando LSMEANS. O efeito de tratamento foi definido de acordo com o teste F da análise de variância e em caso de significância, o conjunto de dados foi submetido ao teste de Tukey

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais não apresentaram diferença no peso final do 1º período ($P > 0,05$). No entanto, o peso final do 2º período, demonstrou uma tendência de efeito ($P = 0,06$), em que os animais do tratamento monensina foi o que apresentou o maior peso (36

kg), seguido dos tratamentos 3,75TO, 2,50TO, controle e 1,25TO (34,90; 34,39; 33,99 e 33,50, respectivamente). O peso final no 3º período também não obteve diferença estatística, mesmo apresentando diferença numérica entre os tratamentos (Tabela 11).

O GMD não apresentou efeito da dieta e não houve interação dieta x período ($P > 0,05$). Foi observado uma diferença para GMD em relação aos períodos ($P < 0,05$), em que é possível observar que o segundo período foi onde os animais conseguiram obter os maiores ganhos de peso ($54,94$; $87,35$ e $79,71 \pm 7,50$ g/dia, nos períodos um, dois e três, respectivamente).

Alguns autores, que trabalharam com doses de monensina próximas a do presente estudo, com animais a pasto e que receberam suplemento no cocho, não encontraram efeito no ganho de peso de cordeiros, porém obtiveram valores de GMD superiores ao do presente estudo (HUSTON; ENGDAHL; CALHOUN, 1990; ARAÚJO et al. 2007). Em trabalho realizado Gastaldello Jr. et al. (2007) com alta proporção de concentrado, porém, suplementado com dose semelhante de Monensina, também não encontraram efeitos no ganho de peso de cordeiros.

Fluharty et al. (1999), trabalhando com cordeiros, não observaram efeito significativo da adição ou não do ionóforo lasalocida sódica no GMD, conversão alimentar e eficiência alimentar dos cordeiros mantidos em pastagens.

Foi observado que no tratamento controle o primeiro período apresentou um ganho de peso muito baixo, quando comparado ao segundo e terceiro períodos ($0,250$; $2,720$ e $2,07$ kg, respectivamente). Como esses animais vinham adaptados ao consumo de rações com alto teor de concentrado, a monensina e o óleo essencial de tomilho podem ter favorecido uma melhor adaptação desses animais à dieta.

Ainda com relação ao ganho de peso dos animais, o tratamento monensina e 2,50TO foram os que apresentaram maior GMD. E entre todos os tratamentos, o 2,50TO foi único tratamento que apresentou, apesar de pequena a diferença, um ganho de peso crescente entre os períodos. Isso indica que o óleo essencial de tomilho na dose de 2,5 mL por kg/MS ainda agiu no metabolismo ruminal, quando comparado à monensina, que apresentou um efeito acentuado no segundo período com ganho de peso muito elevado em relação aos demais tratamentos ($2,99$ kg) e um ganho de peso no terceiro período semelhante ao primeiro ($2,14$ e $2,17$ kg, respectivamente).

Com relação ao CMS (g/dia), não houve efeito da dieta ($P > 0,05$), apesar da diferença numérica (Tabela 11). No entanto, houve efeito do período, onde se observou um crescente aumento no CMS (782, 974 e 1052 g), para os períodos um, dois e três, respectivamente. O CMS em porcentagem do peso corporal seguiu o mesmo comportamento do CMS (g/dia), tendo efeito apenas de período (2,51; 2,94 e 2,97%) para os períodos um, dois e três, respectivamente.

Há pouca informação do efeito do tomilho sobre o CMS e desempenho de ovinos, principalmente com dieta de alto teor de volumoso, mas seus principais componentes ativos (timol e carvacrol) já foram avaliados em alguns experimentos. Em um estudo com cordeiros em crescimento, Chaves et al. (2008) descobriram que a adição de carvacrol ou cinamaldeído não teve nenhum efeito sobre consumo de MS. Resultados semelhantes foram reportados por Benchaar et al. (2006), que não encontraram mudança no CMS de bovinos de corte suplementados com 2 ou 4 g/dia de uma mistura comercial (timol, eugenol, vanilina e limoneno), em dieta à base de silagem. Os resultados do presente experimento não diferem dos citados, onde tanto a monensina como o óleo essencial de tomilho não tiveram efeito sobre o CMS e GMD, apenas o período teve efeito sobre essas variáveis.

Tabela 12 - Peso corporal e desempenho dos cordeiros alimentados com dietas monensina sódica ou óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*)

Item ⁴	Dietas ¹					EPM ²	Valor de P ³		
	Controle	MON	1,25TO	2,50TO	3,75TO		Dieta	Período	Diet*Per
Peso									
Inicial	31,0	30,88	30,16	30,06	30,94	0,89	-	-	-
Final 1º período	31,3	33,05	31,51	32,04	32,59	1,22	0,23	-	-
Final 2º período	34,0	35,99	33,50	34,39	34,90	1,04	0,06	-	-
Final 3º período	36,1	38,13	35,36	36,82	36,66	1,07	0,15	-	-
GMD, g/dia	60,0	86,31	71,66	80,47	71,56	8,98	0,31	0,01	0,19
CMS, g/dia	930	972	912	931	922	25,56	0,54	<0,01	0,75
CMS, %PC	2,85	2,82	2,81	2,83	2,73	0,09	0,81	<0,01	0,53
EA	0,063	0,091	0,082	0,084	0,077	0,01	0,21	0,15	0,44
Coccidiose, oocistos/g	17,6 ^a	2,00 ^b	14,3 ^a	17,1 ^a	18,0 ^a	4,23	<0,01	<0,01	0,36

¹Controle = dieta base; MON = dieta base com adição de monensina sódica; 1,25TO = adição de 1,25 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta base; 2,50TO = adição de 2,50 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta base; 3,75TO = adição de 3,75 mL de óleo essencial de tomilho por kg de MS da dieta base. ²EPM = Erro padrão da média. ³Dieta = efeito de dieta; Período = efeito de período; diet*per = efeito da interação dieta*período ⁴GMD = ganho médio diário de peso corporal; CMS = consumo de matéria seca; CMS, %PC = consumo de matéria seca em porcentagem do peso corporal; EA = eficiência alimentar.

Em alguns estudos foram relatados que óleos essenciais pode reduzir o CMS em bovinos, podendo isso estar relacionado a problemas de aceitabilidade, devendo este ser encapsulado para superar esse problema (CALSAMIGLIA et al. 2007). Apesar do óleo de tomilho ser claramente detectado através do olfato, não modificou o CMS das borregas nas doses utilizadas. Além disso, o CMS pode ser afetado por vários outros fatores, como PC, fase de crescimento do animal, características químicas e físicas da dieta, metabólitos da fermentação ruminal.

A eficiência alimentar (EA), não sofreu efeito de dieta e nem de período. Como não houve diferença sobre CMS e GMD, a eficiência alimentar não foi alterada (Tabela 11).

Como ainda são poucos os estudos com óleos essenciais em desempenho de ovinos, talvez esses resultados possam ser atribuídos ao desconhecimento das melhores doses e da forma adequada de fornecimento. Da mesma forma, vale para a monensina, onde os dados com ovinos, determinando qual a melhor dose de uso são escassos na literatura. Já que a dose recomenda pelo fabricante, muitas vezes não causa um efeito positivo no desempenho. Isso nos faz pensar que talvez a dose deva ser menor que a utilizada.

A coccidiose (oocistos/g de fezes) apresentou diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$). O tratamento MON foi o que apresentou a menor infestação de *Eimeria* spp (2 oocistos/g de fezes; Tabela 11). Como todos os animais utilizados no experimento foram oriundos do próprio sistema de produção do Departamento de Zootecnia, e estes, recebem monensina na dieta e não ocorreu entrada de animais de outras propriedades rurais, não se tem histórico de infestações por *Eimeria* spp. Portanto, os animais não receberam tratamento específico para *Eimeria* spp.

Isso corrobora com o resultado que foi encontrado nesse experimento, onde o tratamento com monensina conseguiu manter a infestação por *Eimeria* spp abaixo dos encontrados nos tratamentos controle e com os óleos essenciais, os quais não diferiram entre si, o que indica que o óleo essencial de tomilho não foi capaz de controlar *Eimeria* spp. Mesmo assim, esta infestação não foi capaz de interferir no ganho de peso e CMS pelos animais.

5.4 CONCLUSÃO

Os aditivos não afetaram o CMS, o desempenho ou a eficiência alimentar das borregas.

Apenas a monensina sódica se mostrou capaz manter infestações baixas de *Eimeria* spp nas borregas.

REFERÊNCIAS

ARAUJO, J. S.; MESQUITA, E. E.; TSUZUKI, N.; OLIVEIRA, V.; NERES, M. A.; BRAGA, G. C.; PEIXOTO, É. C.; VALLE, L. C. Avaliação da monensina sódica no desempenho de cordeiros suplementados a pasto. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, p. 100-106, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg, 1997. 1141p.

_____. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.

BENCHAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 1, p. 91-96, 2006.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CANNAS, A. TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; PELL, A. N.; VAN SOEST, P. J. A. Mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 149-169, 2004

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2801-2808, 2006.

CHAVES, A. V.; HE, M. L.; YANG, W. Z.; HRISTOV, A. N.; McALLISTER, T. A.; BENCHAAR, C. Effects of essential oils on the proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 88, n. 1, p. 117-122, 2008.

FLUHARTY, F. L.; MCCLURE, K. E.; SOLOMON, M. B.; CLEVINGER D. D.; LOWE G. D. Energy Source and ionophoresupplementation effects on lamb growth, carcass characteristics, visceral organ mass, diet digestibility, and nitrogen metabolism. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 816-823, 1999.

GASTALDELLO Jr., A. L.; PIRES, A. V.; SUSIN, I.; MENDES, C. Q.; FERREIRA, E. M.; MOURAO, G. B. Desempenho e características de carcaça de cordeiros alimentados com dietas contendo alta proporção de concentrado adicionadas de agentes tamponantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.556-562, 2010.

HUSTON, J. E.; ENGDAHL, B. S.; CALHOUN, M. C. Effects of supplemental feed with or without ionophores on lambs and angora kid goats on rangeland. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 3980-3986, 1990.

LIMA, J. D. **The coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of the domestic goat, Capra hircus**. 1979. 110 f. Ph. D. Thesis (Doctor in Philosophy in Veterinary Medical Science) - The Graduate College, University of Illinois, Urbana, Illinois, 1980.

MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; LUEBBE, M. K.; WILLIAMS, P.; ENGSTROM, M. A. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 2346-2354, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC). **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D. C: National Academy Press, 2007. 384 p.

PRIOLO, A.; CORNU, A.; PRACHE, S.; KROGMANN, M.; KONDOYAN, N.; MICOL, D.; BERDAGUÉ, J. -L. Fat volatiles tracers of grass feeding in sheep. **Meat Science**, Amsterdam, v. 66, n. 2, p. 475-481, 2004.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

YANG, W. Z.; AMETAJ, B. N.; BENCHAAAR, C.; BEAUCHEMIN, K. A. Dose response to cinnamaldehyde supplementation in growing beef heifers: ruminal and intestinal digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 680-688, 2010.