JOSÉ ALÍPIO FALEIRO NETO

**Impacto de óleos essenciais de plantas brasileiras sobre
parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade e balanço de
nitrogênio em ovinos**

Pirassununga
2015

JOSÉ ALÍPIO FALEIRO NETO

**Impacto de óleos essenciais de plantas brasileiras sobre
parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade e balanço de
nitrogênio em ovinos**

Pirassununga
2015

JOSÉ ALÍPIO FALEIRO NETO

Impacto de óleos essenciais de plantas brasileiras sobre parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires

De acordo: _____

Orientador(a)

Pirassununga
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.3140 Faleiro Neto, José Alípio
FMVZ Impacto de óleos essenciais de plantas brasileiras sobre parâmetros de fermentação ruminal,
digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos / José Alípio Faleiro Neto. -- 2015.
150 f. : il.

Tese (Doutorado) - 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. Ovinos. 2. Rúmen. 3. Extrato de plantas. 4. Aditivos. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Óleos essenciais como manipuladores da fermentação ruminal", protocolado sob o nº 3045/2013, utilizando 25 (vinte e cinco) ovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Essential oils as manipulators of rumen fermentation", protocol number 3045/2013, utilizing 25 (twenty five) ovine, under the responsibility Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 14 de agosto de 2013.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FALEIRO NETO, José Alípio

Título: Efeito de óleos essenciais sobre parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

DATA: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Deus por mais esta vitória, Minha querida Mãe (Maria Ilídia da Paixão), meu pai João Costa, irmãs Roberta, Jordana, e sobrinhos (Paulo Henrique, Paula Rafaela e Gabriela) em especial a minha filha Maria Ilídia Moreira Faleiro que veio para me fortalecer e ensinar como amar de verdade.

Ao Professor Alexandre Vaz Pires pela valiosa amizade, respeito, ensinamentos e confiança.

Aos Professores, Ivanete Susin, Evandro Maia, Paulo Mazza (pelo empréstimos das gaiolas metabólicas), Luis Felipe, Francisco Palma Rennó, Wilson Matos, Carlos Guilherme Pedreira pelos ensinamentos e amizade.

Em especial a Elizangela Mirian Moreira que somou em muito na realização destes experimentos

Aos amigos Doutor Rafael Canonenco de Araujo, Marcos Biehl, Marcos Vinicius ferraz, Daniel Polizel, Renato Shinkai, Ana Paula Freire, Fernanda, Rodrigo Araujo, Angelo Brito, Marcelo, Vinicius Gouvea, Anibal. Samuel Zoca e Tatiane, Luis Schusz e Scheline Schusz, Luciano Cegobias (Oklahoma State University).

Aos funcionários João Paulo (VNP FMVZ), José Boteon e família (USP Pirassununga), Marcos Polizel (SIPOC ESALQ), Roberto Gonçalves (SIPOC ESALQ), Adilson (SIPOC ESALQ), Joseval (SIPOC ESALQ).

Ao Doutor Clint. R. Krehbiel pela oportunidade em poder participar do estágio na Oklahoma State University, pelos ensinamentos, amizade e respeito.

Ao CNPQ pela concessão da bolsa para realização do estágio de doutoramento no exterior.

A todos que somaram para a conclusão deste trabalho.

A Maria Ilídia da Paixão (*in memorian*) e Maria Ilídia Moreira Faleiro

Dedico

Epígrafe

“Esteja atento para nunca desanimar ao ver-se rodeado de tantas fraquezas espirituais.”

(Santo Padre Pio de Pietrelcina)

RESUMO

FALEIRO NETO, J. A. **Impacto de óleos essenciais de plantas brasileiras sobre parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos**. [Effect of essential oils on ruminal parameters fermentation, digestibility and nitrogen balance in sheep]. 2015. 150 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Foram desenvolvidos cinco experimentos com o objetivo de avaliar o efeito do fornecimento de óleos essenciais sobre a fermentação ruminal e a digestibilidade dos nutrientes em borregos. No **experimento I**, avaliou-se um produto comercial tendo como princípio ativo óleo essencial de pimenta (Activo®), os tratamentos experimentais foram: **controle negativo** – ração base (30% de volumoso e 70% de concentrado, % da MS); **controle positivo** - ração base adicionada com 25 mg de monensina sódica por kg de matéria natural e ração base adicionada com 100, 200 ou 300 ppm de Activo® (%MS). Nos quatro experimentos restantes, além dos tratamentos controle negativo e controle positivo descritos para o primeiro experimento, avaliou-se também a inclusão na dieta de 1,09; 2,18 ou 3,27 mL/kg de matéria seca (MS) de óleo essencial extraído do capim cidreira, *Cymbopogon citratus* (**Experimento II**); Óleo essencial extraído do fruto da aroeira-vermelha, *Schinus terebinthifolius* (**Experimento III**); Óleo essencial extraído do capim limão, *Cymbopogon flexuosus* (**Experimento IV**) ou óleo essencial extraído das folhas da aroeira vermelha; *Schinus terebinthifolius* (**Experimento V**). No **experimento I**, não houve efeito dos tratamentos sobre a concentração ruminal de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). No entanto, quando comparados ao controle positivo, o fornecimento de Activo® (%MS) aumentou o consumo de MS e reduziu a digestibilidade dos nutrientes. No **experimento II**, não houve efeito dos tratamentos sobre as características de fermentação ruminal, contudo, a digestibilidade da PB foi maior nas dietas contendo monensina sódica ou óleo essencial de capim cidreira em comparação ao tratamento controle. Nos **experimentos III, IV e V**, não observou-se efeito dos tratamentos sobre nenhuma das variáveis estudadas. Desta forma, os resultados mais promissores foram observados para o experimento com capim cidreira, devido ao benéfico observado sobre a digestibilidade da proteína bruta.

Palavras-chave: Ovinos. Rúmen. Extrato de plantas. Aditivos.

ABSTRACT

FALEIRO NETO, J. A. **Impact of essential oils of Brazilian plants on ruminal parameters fermentation, digestibility and nitrogen balance in sheep.** [Efeito de óleos essenciais sobre parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos]. 2015. 150 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Five experiments were developed in order to evaluate the effect of providing essential oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility in lambs. In the first experiment (**Experiment I**) it was evaluated a commercial product having as active principle pepper essential oil (Activo®), the experimental treatments were: negative control - basal diet (30% roughage and 70% concentrate,% DM); positive control - basal diet plus 25 mg monensin per kg of natural matter (NM) and basal diet plus 100, 200 or 300 ppm Activo® (% DM). The remaining four experiments, besides of the treatments negative and positive control described in the first experiment, were also evaluated the inclusion in the diet 1.09; 2.18 or 3.27 mL/kg dry matter of essential oil extracted from West Indian lemongrass, *Cymbopogon citratus* (**Experiment II**); Essential oil extracted from the fruit of the Brazilian peppertree; *Schinus terebinthifolius* (**Experiment III**); essential oil extracted from Lemon grass; *Cymbopogon flexuosus* (**Experiment IV**) or essential oil extracted from the leaves of the Brazilian peppertree; *Schinus terebinthifolius* (**Experiment V**). In the first experiment, there was no effect of treatments on ruminal concentration of short-chain fatty acids (SCFA). However, when compared to the positive control, the supply of Activo® increased dry matter intake (DMI) and reduced nutrient digestibility. In the second experiment, there was no effect of treatments on ruminal fermentation characteristics, however, the digestibility of CP was higher in diets containing monensin or essential oil of lemon grass compared to the control treatment. In the experiments III, IV and V, there was no effect of treatments on any of the variables studied. Thereby, the most promising results were observed for the experiment with essential oil of lemon grass, because of the beneficial on the digestibility of crude protein.

Keywords: Sheep. Rumen. Plant extracts. Additives. Essential oils. Digestibility

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Animais com arreio para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas.....	41
Figura 2 - Animais com arreio para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas.....	61
Figura 3 - Variação no pH ruminal ao longo dos dias experimentais	70
Figura 4 – Animais com arreiros para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas.....	85
Figura 5 - Animais com arreio para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas.....	107
Figura 6 - Variação na concentração de isobutirato ao longo dos dias.....	117
Figura 7 - Animais com arreios para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas.....	130
Figura 8 - Variação na concentração de ácidos graxos de cadeia curta totais ao longo dos dias	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais.....	42
Tabela 2 -	Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as dietas experimentais.	46
Tabela 3 -	Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes (%) no trato digestório total de ovinos alimentados com as dietas experimentais.....	50
Tabela 4 -	Balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas experimentais	53
Tabela 5 -	Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais (% da MS)	64
Tabela 6 -	Composição do óleo essencial de Capim cidreira (<i>Cymbopogon citratus</i>).....	65
Tabela 7 -	Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as experimentais.	69
Tabela 8 -	Consumo e digestibilidade dos nutrientes por ovinos alimentados com as dietas experimentais	74
Tabela 9 -	Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com as dietas experimentais.	76
Tabela 10 -	Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % da MS	88
Tabela 11 -	Composição do óleo essencial de Aroeira frutos (<i>Schinus terebinthifolius</i>)	89
Tabela 12 -	Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as dietas experimentais (Continua)	93
Tabela 13 -	Consumo e digestibilidade dos nutrientes em borregos alimentados com as dietas experimentais.....	97
Tabela 14 -	Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados como as dietas experimentais	98
Tabela 15 -	Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % da MS	110
Tabela 16 -	Composição do óleo essencial de Capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	111
Tabela 17 -	Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as dietas experimentais	115
Tabela 18 -	Consumo e digestibilidade dos nutrientes em ovinos alimentados com as dietas experimentais.....	121
Tabela 19 -	Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com as dietas experimentais.....	122
Tabela 20 -	Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % da MS	133
Tabela 21 -	Composição do óleo essencial de Aroeira folhas (<i>Schinus terebinthifolius</i>).....	134
Tabela 22 -	Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com dietas experimentais.....	138
Tabela 23 -	Consumo e digestibilidade dos nutrientes de ovinos alimentados com dietas experimentais	143
Tabela 24 -	Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com dietas experimentais	145

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	ÓLEOS ESSENCIAIS COMO MANIPULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	17
2.2	ÓLEOS ESSENCIAIS E AMÔNIA RUMINAL	24
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS NA POPULAÇÃO MICROBIANA DO RÚMEN	24
2.4	ÓLEOS ESSENCIAIS E DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES	26
2.5	MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	29
	REFERÊNCIAS	32
4	Experimento I: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES E PARÂMETROS RUMINAIS DE BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO MISTURA DE ÓLEOS ESSENCIAIS	38
	RESUMO	38
4.1	INTRODUÇÃO.....	39
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.2.1	Animais e instalações	40
4.2.2	Delineamento experimental	41
4.2.3	Tratamentos experimentais e manejo alimentar	42
4.2.4	Colheita e análises de amostras de conteúdo ruminal	43
4.2.5	Colheita de sobras, amostras de fezes e urina	43
4.2.6	Análises laboratoriais	44
4.2.7	Análise estatística	45
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.3.1	Parâmetros ruminais	46
4.3.2	Consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	49
4.3.3	Balanço de nitrogênio	52
4.4	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS	54
6	EXPERIMENTO II: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ALTO CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM CIDREIRA (<i>Cymbopogon citratus</i>)	57
	RESUMO	57
	ABSTRACT	58
6.1	INTRODUÇÃO.....	59
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	60
6.2.1	Animais e instalações	61
6.2.2	Delineamento experimental	61

6.2.3	Manejo alimentar	62
6.2.4	Colheita e análises de amostras de conteúdo ruminal	62
6.2.5	Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes	63
6.2.6	Composição do óleo essencial de Capim cidreira (<i>Cymbopogon citratus</i>)	64
6.2.7	Colheita de sobras, amostras de fezes e urina	65
6.2.8	AGCC e N-amoniaca	66
6.2.9	Análise estatística	66
6.3	Resultados e discussão	67
6.3.1	Parâmetros ruminais	67
6.3.2	Consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	74
6.3.4	Balanço de nitrogênio	76
6.4	CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS		78
7 EXPERIMENTO III: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ALTO CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DO FRUTO DA AROEIRA (<i>Schinus Terebinthifolius</i>)		
RESUMO		82
ABSTRACT		83
7.1	INTRODUÇÃO.....	83
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	84
7.2.1	Animais e Instalações	85
7.2.2	Delineamento Experimental.....	85
7.2.3	Manejo alimentar	86
7.2.4	Colheita e análises de amostras de conteúdo ruminal	86
7.2.5	Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes	87
7.2.6	Composição do óleo essencial de Aroeira frutos (<i>Schinus terebinthifolius</i>).....	88
7.2.7	Colheita de sobras, amostras de fezes e urina	89
7.2.8	AGCC e N-amoniaca	90
7.2.9	Análise estatística	90
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
7.3.1	Parâmetros ruminais	91
7.3.2	Consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	96
7.3.3	Balanço de nitrogênio	98
7.4	CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS		100
8 experimento IV: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM		

LATO TEOR DE CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO (<i>Cymbopogon flexuosus</i>)	103
RESUMO	103
ABSTRACT	104
8.1 INTRODUÇÃO.....	104
8.2 MATERIAIS E MÉTODOS	106
8.2.1 Animais e Instalações	106
8.2.2 Delineamento Experimental.....	107
8.2.4 Coletas e análises de amostras de conteúdo ruminal	109
8.2.5 Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes	109
8.2.6 Composição do óleo essencial de Capim limão (<i>Cymbopogon flexuosus</i>).....	111
8.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina	112
8.2.8 AGCC e N-amoniaco	112
8.2.9 Análise estatística	113
8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
8.3.1 Parâmetros ruminais	114
8.3.2 Consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	120
8.3.3 Balanço de nitrogênio	122
8.4 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS.....	124
9 Experimento V: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ALTO TEOR DE CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DA AROEIRA (<i>Schinus terebinthifolius</i>).....	127
RESUMO	127
ABSTRACT	128
9.1 INTRODUÇÃO.....	129
9.2 MATERIAL E MÉTODOS	129
9.2.1 Animais e Instalações	130
9.2.2 Delineamento Experimental.....	131
9.2.3 Manejo alimentar	131
9.2.4 Coletas e análises de amostras de conteúdo ruminal	132
9.2.5 Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes	132
9.2.6 Composição do óleo essencial de Aroeira folhas (<i>Schinus terebinthifolius</i>).....	134
9.2.8 AGCC e N - amoniaco	135
9.2.9 Análise estatística	136
9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	136
9.3.1 Parâmetros ruminais	136
9.3.4 Consumo e digestibilidade dos nutrientes.....	142

9.3.5	Balanço de nitrogênio	144
9.4	CONCLUSÕES.....	146
	REFERÊNCIAS	147

1 INTRODUÇÃO

Os ionóforos, atualmente são a classe de aditivos mais pesquisados na nutrição de ruminantes. A monensina sódica é utilizada na alimentação de ruminantes desde a década de 70, tendo comprovada ação em diminuir a relação acetato:propionato, reduzir a emissão de metano e consequentemente melhorar a eficiência alimentar (RUSSEL; STROBEL, 1988).

O princípio para melhorar a eficiência alimentar em ruminantes envolve a redução na perda de energia através da melhoria da digestibilidade da dieta e manipulação da fermentação ruminal, visando aumentar a produção de propionato e, assim diminuir a produção de metano no rúmen (KHIAOSA-ARD; ZEBELI, 2013).

No entanto, a utilização de antibióticos e ionóforos na alimentação animal foi proibida na União Europeia desde janeiro de 2006 (diretiva 1831/2003/CEE, COMISSÃO EUROPEIA, 2003). Por esta razão, tem sido interessante aos pesquisadores avaliar alternativas que manipule a fermentação ruminal, incluindo o uso de leveduras, ácidos orgânicos, extratos de plantas, probióticos e anticorpos (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Há séculos, compostos extraídos dos vegetais são utilizados pelas mais diversas civilizações humanas com fins medicinais, industriais e, inclusive, com aplicações na fabricação de alimentos. Muitos extratos vegetais possuem atividade antimicrobiana comprovada (CALSAMIGLIA et al., 2007) e, simultaneamente, grande parte deles possui status GRAS (“generally recognized as safe”) para consumo humano (FDA, 2004), o que lhes confere alternativa natural e segura aos antibióticos.

Os óleos essenciais são um grupo de compostos secundários de plantas obtidos através de frações voláteis das mesmas. São substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis obtidas dos mais variados órgãos vegetais. Os compostos mais importantes dos óleos essenciais são incluídos em dois grupos químicos: terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides.

O interesse em óleos essenciais tem aumentado pelo fato de possuírem atividades antimicrobianas (PATRA; SAXENA, 2010). Consequentemente, podem melhorar a eficiência de utilização de nutrientes e o desempenho de animais ruminantes.

Atividades antimicrobiana, 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), 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.

Os objetivos do presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão de doses de óleos essenciais sobre os parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio em ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO MANIPULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

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. O rúmen é um ambiente extremamente redutor (potencial redox entre -250 e -450 mV) e, por esse motivo, produzir CH_4 é a principal via de remoção de hidrogênio (H^+). Caso haja acúmulo de H^+ , há alta inibição dos sistemas enzimáticos microbianos (RUSSELL, 2002).

Alguns óleos essenciais possuem capacidade semelhante aos ionóforos, de atuar seletivamente sobre as populações microbianas do rúmen (Calsamiglia et al., 2007), alterando o padrão fermentativo, reduzindo a relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ e a produção de CH_4 , o que torna o rúmen energeticamente mais eficiente. As vias metabólicas de produção de C_3 servem de dreno de H^+ , além de não produzi-lo como é observado para as rotas que levam à produção de C_2 (acetato) e butirato (VAN SOEST, 1994). Sendo que, ao maximizar a produção de propionato é competir com as bactérias metanogênicas por substrato.

Equipes de pesquisa da área de microbiologia ruminal têm se dedicado em desenvolver alternativas eficientes para 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).

A manipulação da fermentação ruminal pode ser realizada com a inclusão de aditivos como ionóforos, enzimas fibrolíticas, leveduras, lipídeos e tampões nas dietas, visando otimizar as reações de fermentação dos principais componentes dietéticos (carboidratos e proteína).

Em estudos *in vitro* com óleos essenciais, foi observado sua eficácia em manipular a fermentação ruminal (CASTILEJOS et al., 2006) e 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*, porém sem efeito na digestibilidade da matéria orgânica (CASTILEJOS et al., 2005).

Fadiño et al. (2008), ao trabalharem com bovinos de corte, verificaram efeitos sobre a concentração de AGCC semelhantes à monensina e que os óleos de zimbro e cinamaldeído provocaram aumento numérico na concentração de C_3 e redução numérica na relação $C_2:C_3$ (CHAVES et al., 2008). Um estudo realizado com uma mistura de óleos comerciais de plantas (Biostar®), Bach (2007) também observou aumento na concentração de propionato e redução na relação $C_2:C_3$.

Em relação ao pH, os óleos essenciais podem ter suas composições alteradas pelo pH do meio ambiente ruminal, onde, dietas de alto concentrado com tendências ao abaixamento do pH ruminal há potencialização sobre o efeito dos óleos essenciais. Isto se deve ao fato dos óleos ter a necessidade de estar sob a forma indissociada para interagir com os lipídeos da membrana celular bacteriana (CALSAMIGLIA et al., 2007).

O óleo de canela e seu principal componente (cinamaldeído) foram eficientes em aumentar a relação $C_2:C_3$ quando incubado em meio de cultura em pH 7,0, já em incubação em meio de cultura com pH 5,5, foi observado redução na relação $C_2:C_3$ (CARDOZO et al., 2005).

Já que os ruminantes possuem baixa utilização de nitrogênio, alteração do metabolismo ruminal do nitrogênio seria uma ferramenta visando reduzir a poluição ambiental causada por ureia, podendo também melhorar e/ou otimizar o aporte de aminoácidos para o intestino delgado e assim melhorar o desempenho animal (CALSAMIGLIA et al., 2007). Assim sendo, Benchaar et al. (2008a) concluíram que alguns óleos essenciais diminuem a taxa de desaminação, adesão e colonização de bactérias proteolíticas aos substratos.

O alho (*Allium sativum*), produto usado como tempero, tem sido utilizado por seres humanos como agente microbiano intestinal e, possui uma mistura complexa de vários compostos secundários incluindo alicina ($C_6H_{10}S_2O$). Este óleo essencial foi capaz de manipular a fermentação ruminal reduzindo a relação $C_2:C_3$. Nesse mesmo estudo foi observado redução na produção de CH_4 da ordem de 74% e 69%, respectivamente, efeito este, mais pronunciado do que o observado para a monensina, 42% (BUSQUET et al., 2005b). Em estudo realizado *in vitro*, a adição de 20 $\mu\text{g/mL}$ de alicina reduziu a produção de CH_4 sem efeitos sobre o padrão de AGCC e concentração de NH_3 (McALLISTER: NEWBOLD, 2008).

O conhecimento dos efeitos dos óleos essenciais sobre a metanogênese é muito carente em pesquisas *in vivo*, principalmente os de longa duração. Os

resultados existentes são bastante variados, com alguns trabalhos mostrando resultados promissores.

Efeitos mais prolongados foram observados por Wang et al. (2009), em que 250 mg/d de mistura de óleos essenciais de orégano, em ovinos, reduziram em 12% a quantidade de 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, efeitos que perduraram por 23 dias (KLEVENHUSEN et al., 2010). Em outro estudo, foi observado que 10 mL de óleo essencial de eucalipto reduziu em 31% a emissão de CH₄ por ovinos (SALLAM et al., 2009).

Com objetivos de manipular o ecossistema da microbiota ruminal, melhorando a digestibilidade da fibra, reduzindo a produção de metano e a excreção de nitrogênio e consequente melhora no desempenho de ruminantes, extratos de plantas com alguns compostos secundários (cinamaldeído, eugenol, carvacrol, timol, limoneno) são indicados na alimentação de ruminantes (TEFEREDEGNE, 2000; WANAPAT et al., 2008a).

Sasaponinas são compostos secundários de uma planta conhecida por yucca (*Yucca schidigera*) e trabalhos tem mostrado redução na concentração de amônia e alteração na relação C₂:C₃ no fluido ruminal (GROBNER et al., 1982; RYAN et al., 1997).

Em um estudo realizado *in vitro*, o Timol, composto secundário do orégano (*Origanum vulgare*) adicionado na dose de 400 mg/dL reduziu a concentração de C₂ e C₃ e aumentou a relação C₂:C₃ (EVANS; MARTIN, 2000). Neste estudo, a adição de óleo essencial de orégano afetou somente a proporção C₂ e C₃, desaparecendo os efeitos após os dias 5 e 6 de incubação, respectivamente. Estes resultados indicam que os microrganismos ruminais adquiriram tolerância a dose utilizada do óleo de orégano e sugerem que resultados de experimentos a curto prazo devem ser avaliados com cuidado. Alterações semelhantes foram observadas para óleos essenciais de cinamaldeído, alho e anis, porém não avaliaram o efeito desses aditivos na proporção individual dos AGCC no rúmen.

Cardozo et al. (2004), ao trabalharem com óleo essencial de pimenta não encontraram efeito na concentração individual dos AGCC, somente para a concentração de valerato. Um efeito notável durante o período de adaptação foi observado para os 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 diferença após o dia seis. Estes resultados segundo os autores,

mostram que estes aditivos possuem efeito de curto prazo na fermentação microbiana ruminal e que a adaptação ocorreu após seis dias.

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 apetite são também diminuídos (MOULD et al., 1983; BRITTON; STOCK, 1987). Desta forma, Russel e Dombrowski (1980) mostraram 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.

Com a inclusão de 750 mg/dia de óleos essenciais nas bases de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno observou-se tendência em aumentar a concentração de AGCC total no rúmen para a dieta que continha silagem de alfafa como volumoso único, o que não foi observado quando esta foi substituída pela silagem de milho (BENCHAAR et al., 2007b; BENCHAAR et al., 2008b).

Targer e Krause (2011), ao trabalharem com três óleos (cinamaldeído, eugenol e capsicum) não encontraram efeito para pH ruminal (média 5,72) e AGCC total (média de 129,1 mmol/L). Da mesma forma, Tekippe et al. (2011), trabalharam com vacas em lactação para avaliar o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) na dose de 500mg/dia, e não observaram efeito no pH ruminal e concentração de AGCC total. Também, Hristov et al. (2012), testaram 0, 250, 500 ou 750 g/animal/dia, e não observaram efeito no pH ruminal (média 6,21), concentração de AGCC total (média 135,6 mM), acetato e propionato (médias 83,2 e 29,9 mM) respectivamente. Porém, houve redução na concentração de C₄ variando de 18,3 mM para o grupo controle a 17 mM para os grupos que foram suplementados com óleo de orégano.

Em um trabalho realizado com vacas secas, testando doses 0; 100 e 200 g/animal/dia de óleo essencial de eucalipto, não observou-se efeito no pH ruminal. Porém, houve redução na concentração de AGCC total e acetato (C₂), aumento na concentração de propionato (C₃) e redução na relação C₂:C₃ para o tratamento com dose mais alta do óleo (MANH et al., 2012).

Em novilhas de corte, ao avaliarem doses de eugenol 0; 400; 800 e 1600 mg/animal/dia, os autores observaram redução linear na concentração de C₂, porém, não houve diferença no pH ruminal (média 6,2) e na concentração de C₃ (média 21,6 mmol/L), butirato e AGCC total (média 16,3 e 118,5 mmol/L) respectivamente. Houve tendência em aumentar a proporção molar de C₃ (17,3 para 20,9 mol/100 mol) e a relação C₂:C₃ tendeu a reduzir (4,3 para 3,2 mol/100 mol) quando a dose aumentou de 0 a 1600 mg/animal/dia (YANG et al., 2010a).

Yang et al. (2010b), ao suplementarem bovinos de corte com monensina ou mistura de extratos de plantas (cinamaldeído, eugenol, capsaicina) nas doses de 46,7 mg/kg MS e mistura de extratos composto por cinamaldeído 266 mg/boi/dia com (170 g/kg), eugenol (280 g/kg) e 133 mg/novilho/dia de óleo de capsaicina, não verificaram efeito das doses no pH ruminal (média 5,8), concentrações de AGCC total e AGCC individual.

Com três doses de cinamaldeído, não foi observado efeito no pH ruminal (média 6,2) e nas proporções de C₂, C₃ e C₄. porém, houve tendência em aumentar a concentração de AGCC total de 85 para 106 mmol/L (NEWBOLD et al., 2004).

Anassori et al. (2011), realizaram três experimentos para avaliar o efeito da suplementação do óleo de alho e da monensina em ovinos machos com os seguintes tratamentos: controle negativo (sem aditivos), óleo de alho (75 g/kg MS), dieta com óleo de alho (500 mg/kg MS). No experimento 2, as doses foram semelhantes as do experimento 1 com a diferença de inclusão de óleo de alho nas doses de 100 mg/kg da MS e 750 mg/kg da MS respectivamente. No terceiro experimento, quatro borregos foram alimentados com dieta base de óleo de alho na dose de 75 g/kg da MS, 100 g/kg da MS, 500 mg/kg da MS e 750 mg/kg da MS. Nos três experimentos, Anassori et al. (2011), não encontraram efeitos de tratamento, nem efeito de dia para os valores de pH ruminal com média de 6,43; 6,28 e 6,68 para os experimentos 1, 2 e 3, respectivamente. A concentração de AGCC total com média de 97,04, 95,18, 96,02 mmol/L, respectivamente. Estes autores concluíram que o óleo de alho em geral reduz C₂ e aumenta a concentração de C₃, causando, assim, redução na relação C₂:C₃.

Em outro estudo com dietas contendo alto teor de amido para borregos, observou-se uma redução marcante no pH ruminal e aumento na concentração total de AGCC quando carvacrol ou cinamaldeído foi ofertado aos mesmos (CHAVES et al., 2008a).

Para ovelhas em lactação, doses de timol, eugenol, guaiacol, limoneno e vanilina, da ordem de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de concentrado não foi observado alteração no pH ruminal, com média de 6,6 e não aumentou a proporção molar de C₃ de 19,6 para 24,9 mol/100mol. Com aumento nas doses destes óleos houve tendência em aumentar a concentração de AGCC total de 115,2 para 126,2 mM e tendência em reduzir a proporção molar de C₂ de 67,4 para 62,7 mol/100 mol sem afetar a proporção molar de C₄ com média de 9,8 mol/ 100 mol (GIANNENAS et al., 2011).

Malecky et al. (2009) também não observaram diferenças no pH ruminal e AGCC total em cabras em lactação tratadas com misturas de monoterpênos nas

doses de 0, 0.043 e 0.43 g/kg da matéria seca. Da mesma forma, observou-se Aumento na concentração total de C_3 , porém não houve efeito na relação $C_2:C_3$ e no pH ruminal quando trabalhou com óleo essencial de orégano em ovelhas (WANG et al., 2009).

Ao suplementar cabras em lactação com óleos essenciais nas doses de 2mL de óleo de alho, 2 mL de cinamaldeído, não observou-se efeito para pH (média de 5,92), porém, houve aumento na concentração total de AGCC na proporção de C_3 e C_4 , redução na concentração de C_2 e na relação $C_2:C_3$ (KHOLIF et al., 2012).

Ao adicionar 2,2 mg/L de conteúdo ruminal de óleo essencial de cade (*Juniperus oxycedrus*), observou-se redução na relação $C_2:C_3$ em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a).

Em trabalho realizado com bovinos de corte, encontrou-se redução na concentração total de AGCC, C_2 , C_4 , ácido graxo de cadeia ramificada, relação $C_2:C_3$ e concentração de nitrogênio amoniacal quando o pH diminuiu de 7,0 para 5,5. Porém, houve aumento na concentração de C_3 (CARDOZO et al., 2005)

A adição de cinamaldeído não teve efeito no pH ruminal, na concentração total de AGCC, na proporção molar de C_2 . Entretanto, observaram tendência para interação dia de amostragem vs tratamento e na proporção molar de C_3 . Houve aumento na proporção molar de C_4 , sem efeito para iso C_4 , C_5 e iso C_5 . Houve interação tratamento x dia de amostragem para relação $C_2:C_3$ (FRASER et al., 2007).

Em experimento *in vitro* com óleos essenciais de plantas, nas dosagens de 75 μ L e 150 μ L/mL de líquido ruminal em dietas com alto concentrado (80%) ou alta forragem (feno de Coast cross) para avaliar os parâmetros de fermentação ruminal e digestibilidade dos nutrientes, observou-se que o óleo de Erva-baleeira não alterou os parâmetros de fermentação ruminal. Porém, houve redução na produção de gás para óleos essenciais de aroeira frutos e aroeira folhas na dosagem de 150 μ L (ARAÚJO, 2010). Também observou que os óleos essenciais de aroeira (frutos ou folhas) apresentaram menor produção de CH_4 . Porém as concentrações de AGCC totais e C_2 não foram afetadas pelos óleos aroeira folhas com aroeira frutos nas dosagens de 75 μ L e 150 μ L comparadas ao controle (sem aditivo ou óleo) na dieta de alto concentrado (80%), já para o tratamento com alta forragem houve redução na produção de gás e CH_4 .

A concentração de C_3 e a relação $C_2:C_3$ não foi alterada pelos óleos de aroeira. Enquanto que para o butirato, houve redução no tratamento com 150 μ L de óleo essencial de aroeira folhas para dieta com alta forragem. A concentração de C_4 foi

menor para aroeira folhas na dose de 150 μ L quando comparada ao controle (sem aditivo). Em relação aos isoácidos e valerato, somente o tratamento aroeira frutos 150 μ L reduziu ($P < 0,05$) a concentração de isobutirato para alta forragem. Já para a dieta com alto concentrado (80%), os tratamentos aroeira folhas 150 μ L, aroeira frutos 75 μ L e 150 μ L reduziram ($P < 0,05$) a produção de gás (ARAÚJO, 2010).

Comparando o tratamento controle e aroeira frutos 150 μ L, observou-se redução ($P < 0,05$) na produção de gás e não observou efeito na concentração total de AGCC. A concentração de C_3 foi maior ($P < 0,05$) para os tratamentos aroeira folhas 150 μ L, aroeira frutos 150 μ L e aroeira frutos 75 μ L em relação ao tratamento controle que, segundo o autor, esta resposta foi causada devido à menor produção de gás para aroeira frutos 150 μ L. Em comparação à dieta controle, o óleo essencial de aroeira frutos reduziu à produção de gás quando expressa por unidade de substrato degradado. Houve redução nas concentrações dos isoácidos para os tratamentos com 150 μ L de óleo essencial de aroeira frutos ou folhas. Para os óleos de Capim cidreira (*Cymbopogum citratus*), Capim limão (*Cymbopogum flexuosus*) e Citronela (*Cymbopogum winterianus*), na dieta de alto volumoso, houve redução na produção de gás para as duas dosagens 75 μ L e 150 μ L (ARAÚJO, 2010).

Houve também redução na produção de gás mL/g MO degradada para os óleos essenciais de Capim cidreira (*Cymbopogum citratus*), Capim limão (*Cymbopogum flexuosus*) e Citronela (*Cymbopogum winterianus*), na concentração de 150 μ L.

A produção de CH_4 quando expressa em mL/g MO degradada foi reduzida apenas para o Capim cidreira na concentração de 150 μ L. A concentração de AGCC total e C_3 foram menores para os tratamentos com Capim cidreira, Capim limão e Citronela na dose de 150 μ L e, a concentração de C_2 foi reduzida apenas para Capim cidreira e Capim limão na dose de 150 μ L. Já para a dose de 75 μ L para os três óleos (Capim cidreira (*Cymbopogum citratus*), Capim limão (*Cymbopogum flexuosus*) e Citronela (*Cymbopogum winterianus*)) houve redução na concentração de C_3 sem efeito na concentração de C_2 no tratamento com dieta de alto volumoso. Para dieta de alto concentrado, não foi observada diferença na concentração total de AGCC, porém capim cidreira e capim limão aumentaram ($P < 0,05$) a concentração de C_2 . Não houve efeito na concentração de C_3 (ARAÚJO, 2010).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E AMÔNIA RUMINAL

Ryan et al. (1997) reportaram que a adição de Yuca na dose de 6,25 mg/kg reduziu a concentração de N amoniacal de 17,0 para 15,6 mmol/L após 48 horas de incubação *in vitro*. Da mesma forma, Grobner et al. (1982) encontraram 15% de redução na concentração de amônia após sete dias de fermentação em meio de cultura contínuo com adição de 60 mg/kg de sarsaponina purificada (composto secundário da Yuca).

Anassori et al. (2011) encontraram redução nas concentrações de amônia ruminal ao testar óleo essencial de alho nas doses de 75, 100, 500 e 750 mg/kg de matéria seca para ovinos canulados no rúmen. Redução de 6% na concentração de amônia ruminal em meio de cultura *in vitro* também foi observada por Wallace et al. (1992), trabalhando com dose de 10 mg/L de Yuca.

Por outro lado, em estudo *in vivo*, Wu et al. (1994), trabalharam com dose de 400 mg/kg de Yuca e não encontraram efeito na concentração de amônia ruminal.

A adição de 7,5 mg/kg de cinamaldeído na matéria seca aumentou a concentração de amônia ruminal em 102,5% duas horas após a alimentação e reduziu numericamente a concentração de nitrogênio total 12,5% até oito horas de intervalo de alimentação. Estes resultados indicam que o extrato de cinamaldeído estimula a proteólise e inibe a peptidólise (CARDOZO et al., 2004).

A 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 24 mg/dL de líquido ruminal não sendo necessário que a concentração de amônia no rúmen seja alta e constante ao longo do dia (MEHREZ et al., 1977; VAN DER MERWE et al., 2001).

Fraser et al. (2007) não observaram efeito na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen quando avaliaram cinamaldeído na dosagem de 500 mg/L de conteúdo ruminal.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS NA POPULAÇÃO MICROBIANA DO RÚMEN

Já que os ruminantes possuem baixa utilização de nitrogênio, alteração do metabolismo ruminal do nitrogênio seria uma ferramenta visando reduzir a poluição ambiental causada por ureia, podendo também melhorar e/ou otimizar o aporte de aminoácidos para o intestino delgado e assim melhorar o desempenho animal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

A eficiência de síntese de proteína microbiana foi similar ao tratamento com monensina quando bovinos receberam 2 ou 4 g/dia de óleo essencial de mamona ou caju (CONEGLIAN, 2009).

Os protozoários não são necessários para a fermentação ruminal sendo responsáveis somente pela reciclagem de proteína. Sessenta a 80% da biomassa de protozoários não deixam o rúmen, permanecendo retidos neste compartimento devido ao processo de lise, o que pode aumentar (RUSSEL, 2002) a retenção ruminal de proteína microbiana provocando acúmulo de amônia no rúmen.

Alguns óleos essenciais inibem o desenvolvimento de protozoários no rúmen, além de maximizar a eficiência de síntese de proteína microbiana (LAMBERT et al., 2001).

Em novilhas que receberam óleo essencial de anis em dietas com 90% de concentrado foi observado a redução na população de protozoários totais, menor concentração de amônia ruminal e, redução na relação $C_2:C_3$ (CARDOZO et al., 2006; FADIÑO et al., 2008).

Cardozo et al. (2006), não encontraram efeito nem interação entre os tratamentos na quantidade total de protozoários, em que cinamaldeído aumentou a quantidade de holotricos. Houve efeito de interação entre extrato de alfafa e cinamaldeído.

Anassori et al. (2011), trabalhando com óleo de alho, observaram redução na população de protozoários. Por outro lado, Malecky et al. (2009) observaram que a mistura de monoterpenos não afetam a população de protozoários ruminais. Da mesma forma, óleos essenciais na base de timol, guaiacol e limoneno não afetaram a população de protozoários no rúmen (NEWBOLD et al., 2004). Da mesma forma, Giannenas et al. (2012), também não observaram influencia na população de protozoários e bactérias totais viáveis no rúmen quando trabalharam com óleos na base de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno. Por outro lado, Fraser et al. (2007), observaram redução na quantidade de protozoários totais com adição de cinamaldeído $3,9000 \pm 959,7$ versus $3,9391 \pm 987,2$ protozoários por mL.

Benchaar et al. (2008b) utilizaram cinamaldeído (1g/dia = 43 mg/kg de matéria seca ingerida) e não observaram influência nos protozoários totais sendo a quantidade total de 4,23 log/10mL para o grupo controle e 4,46 log/10mL para o grupo que recebeu cinamaldeído.

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS E DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES

Segundo Firkins et al. (1998), a variável mais importante na nutrição e alimentação dos ruminantes é a quantificação da digestibilidade dos alimentos e nutrientes, pois esta variável é influenciada entre outros fatores por certos ingredientes da dieta e a inclusão de aditivos, o que torna uma razão de que os óleos essenciais têm sido bastante estudados nos últimos anos na nutrição animal.

Para erva-baleeira, houve redução na digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO). Houve redução na DIVMO para óleos essenciais de aroeira frutos e aroeira folhas (ARAÚJO, 2010).

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

Fraser et al. (2007), observaram interação entre tratamento x dia de amostragem para digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica. Por outro lado, não houve interação tratamento x dia de amostragem sobre a digestibilidade da FDN e FDA as quais foram reduzidas, respectivamente.

Targer e Krause (2011), avaliaram doses de óleos essenciais nos compostos de cinamaldeído, eugenol e pimenta para vacas em lactação e não encontraram nenhuma resposta na digestibilidade média da FDN (30,7%), FDA (30,7%), MS (52,5%), MO (54,3%), PB (50,2%) e amido (89,0%).

Ao trabalharem com vacas em lactação Benchaar et al. (2007b) testaram duas doses (0 e 750 mg/d) de uma mistura de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno, e não observaram efeito na digestibilidade da MS com média de (66,4%), PB (61,3%), FDN (52,0%), FDA (52,2%) e amido (97,4%), respectivamente. Porém, em outro experimento, também com vacas em lactação suplementadas com cinamaldeído, não houve diferença nas digestibilidades da MS com médias de 64,0%, MO 66%, FDN 55,0%, FDA 48,0%, PB 61,2% (BENCHAAAR et al., 2008a). Da mesma forma, a digestibilidade dos nutrientes não foi afetada em vários estudos (MALECKY et al., 2009; MEYER et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Ao avaliarem 2 g/dia de óleo essencial de zimbro na dieta de vacas leiteiras, Yang et al. (2007), observaram aumento de 13,0% na digestibilidade da matéria seca em dieta com 40% de volumoso e 60% de concentrado. Porém, as digestibilidades da matéria orgânica, fibra e amido não foram afetadas pelos tratamentos experimentais. Eles sugerem que o aumento da digestibilidade ruminal foi devido ao aumento da digestão da proteína dietética em 11,0%, quando comparado ao tratamento controle. Da mesma forma, a mistura de monoterpenos (45,2% de linalol, 36,7 de p-cimeno, 16,0% de α -pineno e 2,2% de β -pineno) não afetou a digestibilidade dos nutrientes em cabras leiteiras (MALECKY et al., 2009).

Também ao alimentarem ovelhas em dietas com alta concentração de proteína e 500 mg de ropadiar (composto por óleo de manjerição), KAZELOV et al., (2001), não observaram efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes. Por outro lado, Beauchemin e McGinn (2006) e Yang et al. (2010b), concluíram que dietas com altas doses de óleo essencial reduz a digestibilidade da matéria seca e da fibra no rúmen.

Hristov et al. (2013), trabalharam com vacas em lactação nas doses de 0, 250, 500 e 750 mg/vaca/dia de óleo essencial de orégano e não encontraram efeito. Porém, observaram tendência de aumento a digestibilidade da MS com média (65,6%), FDA (46,7%), MO (66,9%) e PB (62,4%), respectivamente. Entretanto, observou-se redução na digestibilidade da FDN da ordem de 51,3% no grupo que recebeu tratamento controle (sem óleo), reduzindo para 49,3% em todos os grupos que receberam as doses de óleo.

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.

Yang et al. (2010a), ao trabalharem com novilhas de corte recebendo doses de eugenol da ordem de 0 e 1600 mg/novilha/dia, observaram redução na digestibilidade da FDN no trato total com efeito de tendência e redução linear com média de 56,1% para 49,4% de modo que a digestibilidade da MO com média de 77,2% e PB 70,5% não foram afetadas. Da mesma forma, Anassori et al. (2011) observaram redução na digestibilidade da MO, FDN e FDA quando avaliaram óleo essencial de alho em ovinos, porém não observaram efeito para o tratamento que recebeu alho puro.

Ao testar baixa concentração (0,5 g/d) ou alta (1,0 g/d) de uma combinação de compostos ativos de óleo essencial (eugenol, carvacrol, citral e cinamaldeído) e outro tratamento com 1g/d da combinação de óleo essencial de orégano, cinamaldeído e limão (Lin et al., 2013), não observaram diferenças na digestibilidade da MS com média de 67,7%, FDN 61,7%, FDA 50,5% entre os tratamentos. Porém, houve redução na digestibilidade da PB para os três tratamentos que incluíram as misturas de óleos essenciais.

Por outro lado, ao testar doses (5 mg, 50, 100 e 500 mg/L) de timol ou eugenol *in vitro* com 24 horas de fermentação, Castilejos et al. (2006) observaram redução da digestibilidade da MS com média de 43,1% na dose mais alta, 500 mg/L em relação ao controle (sem aditivo) com média de 51,0%. Houve também redução na digestibilidade da MO (39,2%), FDN (-1,96%) e FDA (31,3%) em relação ao tratamento controle (49,3, 20,1 e 27,8%), respectivamente.

Mohammed et al. (2004), testaram óleo encapsulado de raiz-forte (20 g/kg de MS consumida) e observaram 19% de redução de CH₄ em novilhos, sem efeitos sobre a população de protozoários ou na digestibilidade ruminal dos nutrientes.

Ao trabalhar com búfalos, Kongmun et al. (2011), em que os tratamentos foram controle (sem aditivo), 7% de óleo de côco, 7% de óleo de côco + 50 g/d de óleo de alho em pó e 7% de óleo de côco + 100 g/d de óleo de alho em pó não foi observado efeito sobre a digestibilidade da MS com média de (63,4%) em nenhum dos tratamentos. Porém, a digestibilidade da MO reduziu para o tratamento com 7% de óleo de côco para 64,0% em relação ao tratamento controle (67,0%), 7% de óleo de côco + 50 g/d de óleo de alho em pó (66,3%) e 7% de óleo de côco + 100 g/d de óleo de alho em pó (65,2%). Em relação à digestibilidade da PB, foi observado valores altamente significantes quando da suplementação com os óleos de côco ou alho em relação ao tratamento controle. Para o tratamento com 7% de óleo de côco + 100 g/d de óleo de alho em pó houve aumento na digestibilidade da FDN, para os demais

tratamentos, houve redução na digestibilidade da FDN e a suplementação com 7% de óleo de côco reduziu a digestibilidade da FDA.

Wanapat et al. (2008b) reportaram que a digestibilidade da MS, MO, CP, FDN e FDA não foram afetadas pelo alho em pó. Porém, houve tendência de aumento na digestibilidade da PB e da FDN no grupo que recebeu o tratamento com alho em pó.

2.5 MECANISMO DE AÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Uma planta pode conter vários metabólitos secundários. Porém, apenas compostos que estão em maior concentração são geralmente isolados e estudados pela fitoquímica e, analisar os compostos ativos, pode ser um trabalho mais complexo e duradouro. Os compostos minoritários estão entre os que apresentam melhores efeitos biológicos (CIRONE SILVA, 2010).

As ações dos óleos essenciais nas células bacterianas estão em sua maioria ligadas à membrana celular principalmente como transporte de elétrons e gradiente de íons (fluxo intra e extra celular da bomba de Sódio e Potássio), translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzimo-dependentes (ULTE; KETS, 1999).

A grande variação nas substâncias químicas presentes nos óleos essenciais, conferem que em suas propriedades antimicrobianas ainda não estejam bem compreendidas e é natural que a atividade antimicrobiana não seja medida por um só mecanismo de ação específico e que pode haver sinergismo entre os modos de ação para os diversos compostos encontrados (BAKKALI et al., 2008).

A maioria das plantas possui compostos que são antimicrobianos e que são capazes de protege-las de microrganismos maléficos. Torna-se então indispensável analisar a potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração, em que a partir desta avaliação pode-se prever se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

Os compostos ativos encontrados em algumas plantas possuem ação antisséptica, sendo: timol, carvacrol, eugenol, isoeugenol e terpinenol-4 (KNOBLOCH et al., 1989).

Geralmente, estes mecanismos de ação são regulados pela desintegração da membrana citoplasmática, desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, coagulação do conteúdo da célula e transporte ativo. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, em que alguns sítios podem ser afetados em consequência de outros mecanismos (BURT, 2004).

Os componentes hidrofóbicos são uma característica importante responsável pela ação antimicrobiana que os óleos essenciais apresentam que permitem a partição de lipídeos da membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas tornando-as mais permeáveis (SIKKEMMA, 1994).

Os componentes dos óleos essenciais agem também em proteínas da membrana citoplasmática, em que hidrocarbonetos cíclicos podem agir sobre enzimas ATPases conhecidas por estarem localizadas na membrana citoplasmática e rodeadas por moléculas lipídicas. Hidrocarbonetos lipídicos poderiam distorcer a interação lipídio-proteína. Interação direta dos compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas também são possíveis (SIKKEMMA, 1995).

O carvacrol e timol diferem pela localidade do grupo hidroxila sobre o anel fenólico. Estes compostos parecem tornar a membrana mais permeável (LAMBERT et al., 2001). Ambas estruturas desintegram a membrana externa de bactérias liberando lipopolissacarídeos aumentando assim, a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP. Na forma indissociada o carvacrol se difunde pela membrana citoplasmática e atinge o interior da célula, ocorrendo dissociação e liberação de próton. Em seguida o carvacrol liga-se ao K^+ retornando ao meio extracelular e carregando consigo este íon ou outro qualquer. No exterior da membrana, ocorre nova dissociação com liberação de K^+ e liberação de novo H^+ .

Borchers (1965) constatou que o timol inibiu a deaminação de proteínas observando redução na concentração de NH_3 e acúmulo de aminoácidos nos microrganismos ruminais.

Cinamaldeído é bastante conhecido por ter ação inibitória sobre *E. coli* e *Salmonella Typhimurium* em concentrações próximas a do carvacrol e timol, mas não desintegra a membrana externa e nem diminui a produção de ATP intracelular (HELANDER et al., 1998).

Para eugenol, foi observado que o mesmo inibiu a produção de amilase e proteases por *B. cereus* degradação e lise da parede celular também foram encontradas (THOROSKI et al., 1989).

Um dos principais objetivos do uso de óleos essenciais na alimentação de ruminantes é realização de estudos que visam identificar substâncias capazes de melhorar os efeitos na concentração e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) principalmente no que diz respeito à produção de C_3 sem afetar ou diminuir a produção total de AGCC.

Encontrar doses e/ou compostos capazes de manipular com efeito positivo a fermentação ruminal, torna-se um grande desafio aos nutricionistas. Alguns estudos mostraram que alguns óleos essenciais podem apresentar efeitos semelhantes aos ionóforos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- 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.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, Amsterdam, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- 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.; BERTHIAUME, R.; PETIT, H. V.; OUELLET, D. R.; CHIQUETTE, J. Effects of essential oil supplement on nutrient, digestibility, nitrogen retention, duodenal bacterial nitrogen flow, milk production and composition in lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 638, 2003b. Abstract.
- 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. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2008a.
- 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**, v. 87, p. 413-419, 2007a.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; DE OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. 616 p.
- 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. **Oklahoma Agriculture Experimental**. Stn. MP-121, p. 125-137, 1987.
- 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, 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.

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 alfafa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 10 p. 2801-2808, 2006.

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.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for the effects of natural plants extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2572-2579, 2005.

CASTILEJOS, 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.

CASTILEJOS, 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.; STANFORD, K.; DUGAN, M. E. R.; GIBSON, L. L.; McALLISTER, T. A.; VAN HERK, F.; BENCHAAAR, C. Effects of cynamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites growth performance and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 17, p. 215-224, 2008.

CHAVES, A. V.; STANFORD, K.; GIBSON, L. L.; McALLISTER, T. A.; BENCHAAAR, C. Effects of carvacrol and cynamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance and carcass characteristics of growing lambs. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 145, p. 396-408, 2008a.

CONEGLIAN, S. M. Uso de óleos essenciais de mamona e caju em dietas para bovinos. 2009. 100 p. (Tese de Doutorado) **Universidade Estadual de Maringá**, Maringá, 2009.

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.

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.

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.

GROBNER, M. A.; JOHNSON, D. E.; GROOBAL, S. R.; BENZ, D. A. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. **Journal Animal Science**, v. 55, p.491-497, 1982.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, L.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

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.

HRISTOV, A. N.; TEKIPPE, J. A.; HEYLER, K. S.; CASSIDY, T. W.; ZHELJASKOV, V. D. KARNATI, S. K.; VARGA, G. A. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. In Lactating dairy cows. In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 4., 2010, Banff. **Proceedings...** Banff, 2010. p. 126

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press. 1966. p. 117-132.

KHAN, M. M. H.; CHAULDHRY, 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.

KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. Meta analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1819-1830, 2013.

- 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: McGEOUGH, E. J.; MCGINN, S. M (Eds.). In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 4., 2010, Banff. **Proceedings...** Banff, Canadá, 2010. p. 126. Resumo T73.
- 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.
- KONGMUN, P.; WANAPAT, M.; PAKDEE, P.; NAVANUKRAW, C.; YU, Z. Manipulation of rumen fermentation and ecology of swamp buffalo by coconut oil and garlic powder supplementation. **Livestock Science**, v. 135, p. 84-92, 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 Applied Microbiology**, v. 91, 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**, v. 154, 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 Melbourne, v. 48, n. 1/2, p. 7-13, 2008.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSCOV, E. R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **Brithish Journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 437-443, 1977.
- MEYER, N. F.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; GREENQUIST, M. A.; LUEBBE, M. K.; WILLIAMS, P. P.; ENGSTROM, M. A. Effect of essential oils, thylosin and monensin, on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation and digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 87, 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 of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 6, 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 cellulosis *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.

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**, v. 114, p. 105-112, 2004.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites inhibit methanogenesis in the rumen. **Journal of Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.

PATRA, A. K.; KAMRA, D. N.; AGARWAL, N. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme actives and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 128, n. 3/4, p. 276-291, 2006.

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.

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparision of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, n. 2, p. 552-558, 1988.

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

RYAN, J. P.; QUINN, T.; LEEK, B. L. Comparision of effects of Yucca schidigera plant extract (De-Odorize) and Saccharomyces cerevisiae yeast culture, on pH, short chain fatty acids (SCFA) and ammonium, during fermentation of hay by sheep`s ruminal fluid in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3222-3230, 1997.

SALLAM, S. M. A.; NASSER, M. E. A.; ARAUJO, R. C.; ABDALLA, A. L. Methane production by sheep consuming diets with diffeent 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, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Effects of addition of an essential oil complex to the diet lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 64-71, 2010.

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.

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.

TEFEREDEGNE, B. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. **Proceedings Nutritional Society**, v. 59, p. 209-214, 2000.

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.

THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C. Eugenol induced inhibition of extracellular enzyme production by *Bacillus cereus*. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 4, p. 399-403, 1989.

VAN DER MERWE, B. J.; DUGMORE, T. J.; WALSH, K. P. The effect of flavophospholipol (Flavomycin) on milk production and milk urea nitrogen concentration of grazing dairy cows. **South Africa Journal of Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 101-105, 2001.

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

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings Nutritional Society**, v. 63, p. 621-629, 2004.

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.

WU, Z.; SADIK, M.; SLEIMAN, F. T.; SIMAS, J. M.; PESSARAKLI, M.; HUBER, J. T. Influence of yuca extract on ruminal metabolism in cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1038-1042, 1994.

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

YANG, W. Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B. N.; BEUCHEMIN, K. A. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 57-64, 2010a.

YANG, W. Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B. N.; CHAVES, A. V.; HE, M. L.; McALLISTER, T. A. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5671-5681, 2011.

4 EXPERIMENTO I: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES E PARÂMETROS RUMINAIS DE BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO MISTURA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

RESUMO

Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da inclusão da mistura de óleos essenciais, sobre os parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio. Os tratamentos experimentais consistiram de: Controle negativo, CTL (sem óleo essencial); Controle positivo (com adição de 25 ppm de monensina, MON); AC100 (10.000 mg do óleo essencial / 100 kg de matéria natural da dieta), AC200 (20.000 mg do óleo essencial / 100 kg de matéria natural da dieta) e AC300 (30.000 mg do óleo essencial / 100 kg de matéria natural da dieta). Cinco borregos da raça Santa Inês canulados no rúmen, com $67,0 \pm 2,50$ kg de peso corporal foram distribuídos em delineamento experimental tipo quadrado latino 5 x 5. Não houve efeito sobre as concentrações individuais de AGCC, nem para concentração de AGCC totais. Houve aumento ($P < 0,01$) na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen ao utilizar a mistura de óleo essencial. Não verificou-se efeito sobre o pH ruminal. Houve redução ($P = 0,02$) do CMS kg/dia, CFDN ($P = 0,01$), CMO ($P = 0,02$), CPB ($0,02$), CEE ($P < 0,01$) e CCNF ($P = 0,02$) nos tratamentos controle e doses de óleo essencial em comparação ao tratamento MON. Não houve efeito sobre o CMSPC e CFDN % PC. Houve redução ($P = 0,01$) na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica ($P = 0,01$) e CNF ($P < 0,01$) nos tratamentos controle e doses de óleo essencial em comparação ao tratamento MON. Houve tendência para redução ($P = 0,08$) da digestibilidade da proteína bruta quando da utilização da mistura de óleo essencial. Não houve efeito na digestibilidade da FDN e na digestibilidade do extrato etéreo. Houve aumento ($P = 0,02$) no consumo de N g/dia, onde o menor consumo foi observado no tratamento com MON, sendo 10,0% e 19,0% menor que o observado nos tratamentos CTL e os contendo óleo essencial. Houve tendência de aumento ($P = 0,09$) na excreção diária de N na fezes, g/dia, nos tratamentos CTL e doses de óleo essencial em relação ao MON.

Palavras-chave: Óleo essencial. Manipulação da fermentação ruminal. Digestibilidade dos nutrientes. Balanço de nitrogênio. Ovinos. Monensina Sódica.

ABSTRACT

This experiment was conducted to evaluate the effect of inclusion of blended essential oils (ACTIVO®) on ruminal fermentation parameters, nutrient digestibility and nitrogen balance. The experimental treatments were: Negative control, CTL (no essential oil); positive control, MON (addition of 25 ppm of Sodium Monensin); AC100 (10.000 mg of essential oil / 100 kg as fed diet); AC200 (20.000 mg essential oil / 100 kg as fed diet) and AC300 (30.000 mg of essential oil / 100 kg as fed diet). Five lambs of the Santa Ines breed cannulated in the rumen with 67.0 ± 2.50 kg of body weight were divided into experimental design Latin square 5 x 5. There was no effect for the individual concentrations of SCFA, or to concentration of total SCFA. There was a significant increase ($P < 0.01$) in the concentration of ammonia in the rumen when the utilization of blend essential oils. There was no effect on ruminal pH. There was increase ($P = 0.02$) for DMI kg / day, NDF ($P = 0.01$), BMC ($P = 0.02$), CCP ($P = 0.02$), EEC ($P < 0.01$) and CNFC ($P = 0.02$). There was no effect on dry matter intake for body weight and NDF% PC. There was a decrease ($P = 0.01$) in dry matter and organic matter digestibility ($P = 0.01$) and NFC ($P < 0.01$) for the CTL and blended essential oil in comparison with MON. There was a trend to decrease ($P = 0.08$) the digestibility of crude protein. There was no effect for NDF and ether extract digestibility. An increase ($P = 0.02$) of N intake g / d, CTL ACTIVO® was observed in comparison with MON. There was a trend ($P = 0.09$) on daily excretion faeces of N g/day, increasing the CTL and the blended essential oils treatments in comparison with MON.

Key words: Essential oils. Rumen fermentation. Nutrients digestibility. Nitrogen balance. Sheep. Sodium monensin

4.1 INTRODUÇÃO

A União Européia, em 2006, proibiu a utilização de antibióticos na alimentação animal devido ao fato de causar riscos à saúde humana. Neste contexto, pesquisadores vem estudando alternativas da utilização de compostos naturais, como óleos essenciais de plantas, visando substituir a monensina sódica como manipulador da fermentação ruminal, otimizando a eficiência de utilização dos nutrientes pelos ruminantes (CARDOZO et al., 2004).

Várias plantas produzem compostos fenólicos secundários, sarsaponinas e óleos essenciais que podem afetar a atividade microbiana no rúmen, alterando as concentrações de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, bem como a relação C₂:C₃ que pode tornar o rúmen mais eficiente energeticamente (WALLACE et al., 1994).

Aditivos alimentares têm sido desenvolvidos visando alterar as concentrações de C₂ e C₃ no fluido ruminal (GROBNER et al., 1982). Porém, alguns estudos mostram redução nas concentrações tanto de acetato como propionato, aumentando, assim, a relação C₂:C₃ (EVANS; MARTIN, 2000).

O ACTIVO® é uma mistura de óleos essenciais microencapsulados que contém em sua composição, carvacrol, eugenol, cinamaldeído e oleorresina de pimenta, produzido pela GRASP Indústria e Comércio LTDA.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão de ACTIVO® sobre as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, consumo e digestibilidade dos nutrientes e, balanço de nitrogênio em ovinos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido nas instalações 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, localizada em Piracicaba – SP (22° 42' 24" S e 47° 37' 53" O), Brasil.

4.2.1 Animais e instalações

Animais provenientes de outros experimentos, preparados cirurgicamente com cânulas ruminais, foram alojados individualmente em baias (Tie stall) no período dos dias zero ao dia 18 e, em seguida, foram colocados arreios e transferidos para gaiolas metabólicas com dimensões de 1,30 x 0,55 m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina separadamente (Figura 1).

Figura 1 - Animais com arreio para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas

Fonte: Arquivo pessoal

4.2.2 Delineamento experimental

Cinco borregos da raça Santa Inês, canulados no rúmen com peso médio de 40 kg e seis meses de idade foram utilizados para determinar a melhor dose de ACTIVO® *in vivo*. O período experimental teve duração de 130 dias, sendo divididos em cinco sub-períodos de 26 dias, dos quais 7 dias foram destinados a um período tampão (“wash-out” período) para remoção dos efeitos dos tratamentos do período anterior no próximo período, 14 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais, 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 quadrado latino 5 x 5, sendo cinco períodos experimentais e cinco tratamentos: controle (sem óleo essencial e sem monensina), baixa dose (10.000 mg/100 kg de Matéria natural (MN); dose média (20.000 mg/100 kg MN); dose alta (30.000 mg/100 kg MN) e Rumensin 200® Elanco do Brasil (25 mg/kg de ração).

4.2.3 Tratamentos experimentais e manejo alimentar

Os animais foram alimentados com uma ração base para exigência de manutenção, contendo 70% de concentrado e 30% de volumoso (% MS). A ração base foi formulada de acordo com as recomendações do NRC (2007). A ração foi ofertada duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas, sendo as 7:00 e 19:00 horas. Diariamente as sobras foram pesadas para ajuste da quantidade ofertada visando obter 10% de sobras. A proporção dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹				
	CTL	MON	AC100	AC200	AC300
Ingredientes, (% MS)					
Feno de Coast-Cross	29,19	29,19	29,19	29,14	29,14
Farelo de soja	16,36	16,36	16,10	16,10	16,10
Milho moído	32,12	32,12	31,90	32,0	32,00
Casca de soja	20,06	20,06	20,06	20,06	20,06
Cloreto de amônio	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4
Calcáreo	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Mistura mineral ²	1,37	1,37	1,37	1,37	1,37
Activo [®] (g/100 kg)	0	0	10,0	20,0	30,0
Rumensin 200 [®] 12,5 g/100kg	0	12,50	0	0	0
Composição Química, (%)					
MS (% da MO)	88,68	88,68	88,68	88,68	88,68
Matéria orgânica	94,68	94,68	94,68	94,68	94,68
Proteína bruta	14,57	14,57	14,57	14,57	14,57
Extrato etéreo	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10
FDN ³	32,27	32,27	32,27	32,27	32,27
CNF ⁴	44,73	44,73	44,73	44,73	44,73

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de MS); AC100 = (10.000 mg de uma mistura de óleo essencial ACTIVO[®]/ 100 kg de matéria natural); AC200 = (20.000 mg de uma mistura de óleo essencial ACTIVO[®]/ 100 kg de matéria natural); AC300 = (30.000 mg de uma mistura de óleo essencial ACTIVO[®]/ 100 kg de matéria natural).

²composição: Ca 13,4%, P 7,5%, Mg 1%, S 7%, Cl 21,8%, Na 14,5%, Mn 1100 mg/kg, Fe 500 mg/kg, Zn 4600 mg/kg, Cu 300 mg/kg, Co 40 mg/kg, I 55 mg/kg, Se 30 mg/kg.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro

⁴ Carboidratos não fibrosos = 100- (PB+EE+FDN+MM)

4.2.4 Colheita e análises de amostras de conteúdo ruminal

As colheitas de fluido ruminal foram realizadas no 26^o dia de cada período experimental nas horas zero, 3, 6, 9 e 12 horas após o arraçoamento. Em cada momento de coleta, o conteúdo ruminal foi filtrado em tecido de nylon com poros de 150 micras. Esta colheita teve como objetivo avaliar a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal no rúmen (N-NH₃).

Logo após cada colheita de fluido ruminal, foi realizada a medição imediata do pH em potenciômetro digital (DIGIMED® DM20). Do fluido filtrado, foram retiradas duas alíquotas de 25 mL e estas foram imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C.

4.2.5 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Diariamente as sobras de cada unidade experimental foram pesadas, amostradas (10 %) e composta por tratamento.

Após o período de adaptação, nos dias 22, 23, 24 e 25 de cada período às 7:00 horas da manhã, a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foi mensurado. As fezes foram pesadas em balança de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, foram amostradas (10%) a produção fecal e de urina diária. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos colhedores das gaiolas em vasilhames contendo ácido clorídrico 6N, 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 medido o consumo de ração, com base no consumo diário de ração foi realizada a oferta do dia posterior, de modo que as sobras não fossem superiores a 10% da quantidade ofertada, sendo colhida amostras das mesmas no último dia para análises bromatológicas para determinação da digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Amostras da ração ofertada, das sobras, fezes e urina foram compostas por animal e por período experimental e conservadas a -20^o C para posteriores análises.

Todos os animais foram pesados, no primeiro e no último dia de cada período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

4.2.6 Análises laboratoriais

Depois de descongeladas, as amostras das rações ofertadas, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 65 °C por 72 horas. Em seguida, todas as amostras 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 orgânica (MO) foi obtida por meio da incineração da amostra em forno 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). O teor de extrato etéreo foi determinado utilizando um aparelho Leco TFE2000 (LECO® Corp.). A concentração de FDN foi determinada conforme VAN SOEST. (1992), 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).

Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados de acordo com a equação: $CNF (\%) = 100\% - (\% FDN + \% CP + \% EE + \% MM)$.

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total foi calculada subtraindo-se a quantidade consumida de cada nutriente pela excreção fecal do respectivo nutriente. O N retido foi calculado pela diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina. O N retido foi expresso em % do N consumido e em % do N digerido.

Para determinação dos AGCC; 1,3 mL de fluido ruminal adicionado com 0,3 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15 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 μ L 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 Agilent Technologies). A injeção foi realizada de maneira automática, o gás de arraste foi o H_2 , 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-NH_3 foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (BIO – RAD, Hercules, CA), utilizando-se filtro para absorvância de 550 nm.

4.2.7 Análise estatística

Os dados das características de fermentação ruminal do experimento foram analisados usando o procedimento MIXED do SAS (2002). As médias de cada tratamento foram obtidas utilizando o comando LSMEANS. Foram analisadas através da comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5% sendo apresentado na forma de tabelas. Foram considerados como tendência entre 5 e 10%. Os dados de consumo, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados utilizando o procedimento “MIXED” do SAS (2002). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. Os efeitos foram declarados significativos quando $P < 0,05$.

Os dados referentes ao consumo e digestibilidade dos nutrientes foram analisados conforme o modelo que segue: $Y = \mu + A_i + D_j + K + P_k + E_{ijk}$, em que μ = média, A_i = efeito de animal ($i = 1$ a 5), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5), P_k = efeito de período ($k = 1$ a 5) e E_{ijk} = erro experimental.

Os dados de características de fermentação ruminal (Activo®) foram analisados conforme o modelo que segue: $Y = \mu + A_i + D_j + K + P_k + E_{ijk}$, em que μ = média, A_i = efeito de animal ($i = 1$ a 5), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5), P_k = efeito de período ($k = 1$ a 5) e E_{ijk} = erro experimental.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Parâmetros ruminais

Não houve efeito de tratamento sobre as concentrações de acetato, propionato. Consequentemente a concentração de AGCC totais não foram afetadas pelos tratamentos (Tabela 2). A ausência de efeito sobre os AGCCs pode ser atribuída ao baixo peso molecular do carvacrol que, como é comprovado, a interrupção do carvacrol em altas dosagens em permear a membrana da célula de bactérias gram positivas, principais produtoras de acetato (SIVROPOULOU et al., 1996).

Busquet et al. (2006), ao testar doses de orégano da ordem de 300 e 3.000 mg/L de conteúdo ruminal em vacas em lactação, concluíram que altas doses destes compostos inibem os parâmetros de fermentação ruminal, principalmente no que diz respeito a produção de amônia no rúmen e AGCCs devido a esses produtos (óleos) atuarem inibindo a atividade de algumas bactérias ruminais.

Tabela 2 - Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P
	CTL	MON	AC100	AC200	AC300		
AGCC, mM/100mM							
Acetato (C ₂)	65,72	65,31	66,74	67,03	67,29	0,55	0,77
Propionato (C ₃)	20,07	20,47	18,06	18,33	18,09	0,78	0,80
Isobutirato	1,02	0,98	1,06	1,01	0,99	0,03	0,76
Butirato (C ₄)	10,53	10,56	11,31	10,84	10,91	0,40	0,95
Isovalerato	1,57	1,60	1,76	1,71	1,59	0,05	0,46
Valetaro (C ₅)	1,10	1,08	1,08	1,09	1,14	0,03	0,94
C ₂ :C ₃	3,47	3,38	3,75	3,79	3,77	0,14	0,86
Total AGCC, mM/l	107,50	103,08	105,21	109,66	106,69	4,42	0,82
N-NH ₃ , mg/dL	13,99 ^{bc}	9,96 ^c	15,45 ^b	11,45 ^{bc}	21,25 ^a	0,04	<0,01
pH	6,29	6,27	6,23	6,23	6,21	0,04	0,76

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural); AC100 = (10.0 g de óleo uma mistura de essencial ACTIVO® / 100 kg de matéria natural); AC200 = (20.0 g de óleo essencial ACTIVO® / 100 kg de matéria natural); AC300 = (30.0 g de óleo essencial ACTIVO® / 100 kg de matéria natural).

² EPM = erro padrão da média

Geralmente, os efeitos relatados em relação ao uso de óleos essenciais nos parâmetros de fermentação ruminal tem sido inconsistentes devido a grande variedade de produtos, compostos ativos, doses utilizadas, modos de fornecimento e condições experimentais (BENCHAAR et al., 2009). O que mostra que os efeitos dos

óleos essenciais são dose dependente e, quando em doses elevadas, a maioria dos óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana, inibindo a fermentação ruminal, concentração de amônia e AGCCs (BUSQUET et al., 2006; BENCHAAAR et al., 2009).

Os dados do presente estudo não estão de acordo com Bach (2007) que, ao testar uma mistura de óleos essenciais comerciais, observou aumentos nas concentrações de propionato e redução na relação acetato/propionato. Também, Fadiño et al. (2008), ao testarem óleo essencial de Anis, não verificaram diferenças na relação $C_2:C_3$, concluindo que alguns óleos essenciais reduzem a capacidade de adesão e colonização de bactérias proteolíticas aos substratos. Em um estudo in vitro com alicina, não foi observado efeitos sobre a concentração de AGCC (McALLISTER; NEWBOLD, 2008).

De acordo com o presente estudo, cinamaldeído, eugenol e capsicum não foram eficazes em atuar sobre as concentrações de AGCCs individuais e AGCC totais (TARGER; KRAUSE, 2011).

Tekipe et al. (2011), trabalhando com vacas Holandesas em lactação, utilizando dose de 500 mg/dia, não verificaram efeitos para concentrações de AGCCs totais ou individuais, o que também está de acordo com o presente estudo.

Manh et al. (2012), testando doses de 0, 100, 200 g/dia de óleo essencial de eucalipto, não verificaram efeitos sobre pH ruminal, o que está de acordo com o presente estudo porém, verificaram reduções nas concentrações de AGCCs totais, acetato e, aumentos nas concentrações de propionato e consequentemente, redução na relação C_2/C_3 , o que não foi observado no presente estudo.

Yang et al. (2010a), ao avaliarem doses de eugenol nas concentrações de 0, 400, 800, 1600 mg/animal/dia, não verificaram efeitos nas concentrações de C_3 e AGCC totais. Os dados do presente estudo estão de acordo com esses autores, uma vez que os animais consumiram em média 1,97 kg de matéria natural por dia e a concentração mais baixa do ACTIVO® foi de 10.000 mg/100 kg de MN, intermediária, 20.000 mg/100 kg de MN e alta, 30.000 mg/100 kg de MN. Estes animais consumiram 197, 394 e 591 mg de ACTIVO® por dia, que estão entre as 400 e 800 mg utilizados pelo autor acima citado, sem efeito nos parâmetros ruminais.

A ausência de efeito com as doses da mistura do óleo essencial utilizado no presente estudo, foi também observada por Yang et al. (2010b), que, suplementando bovinos de corte com monensina ou mistura de extratos de plantas (cinamaldeído, eugenol, capsaicina) nas doses de 46,7 mg/kg MS e mistura de extratos composto por cinamaldeído 266 mg/boi/dia, eugenol 280 mg/animal/dia e 133 mg/boi/dia de óleo

de capsaicina, os autores não verificaram efeito das doses no pH ruminal, concentrações de AGCC total e AGCC individual.

Malecky et al. (2009), ao testar a mistura de monoterpenos nas doses de 0,043 e 0,43 g/kg de matéria seca dietética para cabras em lactação, não verificaram efeitos sobre as concentrações de AGCCs totais e individuais. Já Kholif et al. (2012), suplementando cabras em lactação com óleo essencial de alho (2 mL/cabra/dia), verificaram efeitos nas concentrações totais de AGCC, nas concentrações de C₃ e C₄, redução na concentração de acetato e, conseqüentemente, redução na relação C₂/C₃, o que não foi observado no presente estudo mesmo transformando a dosagem mais alta da mistura do óleo essencial usado no presente estudo (300 AC) daria 0,34 g/kg de MS, também não foi capaz de alterar as concentrações de AGCCs.

Houve efeito ($P < 0,01$) na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen onde as maiores concentrações foram observadas nos tratamentos CTL, 10.000 e 30.000 (mg/ 100 kg de MN) de ACTIVO®, sendo da ordem de 13,99; 15,45 e 21,45 mg/dL, respectivamente (Tabela 2). Estes dados mostram a capacidade de proteólise e deaminação de aminoácidos valina, lisina e leucina, onde observa-se maiores concentrações de isobutirato e isovalerato para os tratamentos que receberam ACTIVO®. Neste contexto, pode-se afirmar que as maiores concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen está associada, principalmente, com as menores digestibilidades da MS, MO e forte tendência para menor digestibilidade da PB para CTL e tratamentos que receberam as doses deste óleo essencial, o que pode ter reduzido a disponibilidade de energia no rúmen para que as bactérias melhorem sua eficiência de utilização deste nutriente.

Os dados do presente estudo estão de acordo com Busquet et al. (2006) e Benchaar et al. (2009), que concluem que altas doses da maioria dos óleos essenciais atuam inibindo a atividade microbiana e fermentação ruminal, porém não estão de acordo para as concentrações de nitrogênio no rúmen. Neste contexto, no presente estudo, observou-se menor síntese de proteína microbiana nos tratamentos que receberam óleo essencial o que pode ser confirmado pela maior concentração de N-NH₃ para estes tratamentos.

Por outro lado, não estão de acordo com Anassori et al. (2011), que verificaram redução nas concentrações de amônia ruminal o que indica menor proteólise e/ou deaminação no rúmen para os tratamentos que receberam óleo essencial. Ryan et al. (1997), reportaram que a adição de Yuca na dose de 6,25 mg/kg de MN foi capaz de reduzir a concentração de N amoniacal de 17,0 para 15,6 mmol/L após 48 horas de

incubação *in vitro*. Já Fraser et al. (2007), não observaram efeito na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen quando trabalhavam com cinamaldeído na dosagem de 500 mg/L de conteúdo ruminal.

Ao contrário do presente estudo, vários outros autores não verificaram efeitos nas concentrações de amônia ruminal quando testaram óleo essencial de alho (CASTILLEJOS et al., 2006; CHAVES et al., 2008; WANAPAT et al., 2008). Estes autores mais uma vez confirmam os dados do presente estudo, afirmando que a discrepância entre os dados entre diversos experimentos se deva ao fato da diferença nos mesmos, composição e quantidade de óleo essencial utilizado, como também a via de administração dos mesmos.

Não houve efeito dos tratamentos sobre o pH ruminal (Tabela 2). Visto que o pH ruminal é mais influenciado pela quantidade e tipo de nutriente consumido, são poucos os resultados na literatura que mostram efeito do fornecimento de óleo essencial sobre esta variável. Esta ausência de efeito pode ser explicada pelo fato de os animais terem sido bem adaptados às dietas experimentais e, mesmo com efeitos nas digestibilidades da MS e MO, não foi observado efeitos nas concentrações de AGCC totais e individuais visto que estas variáveis, pH e AGCCs, possuem relação inversa (VAN SOEST, 1994).

Targer e Krause (2011), não verificaram efeito para pH ruminal quando da adição de óleos essenciais na base de cinamaldeído, eugenol e capsaicina. Tekipe et al. (2011), ao testarem óleo essencial de orégano para vacas em lactação, não verificaram efeitos sobre o pH ruminal, o que mais uma vez confirma os dados do presente estudo, em que, para pH ruminal, os efeitos dos óleos essenciais na maioria das vezes são nulos.

Ao Testar quantidades crescentes de eugenol e cinamaldeído 0, 250, 500 e 750 (mg/animal/dia), Hristov et al. (2012) não observaram efeitos sobre pH ruminal com média de 6,21. Os dados do presente estudo estão de acordo com este autor, cuja a média do pH ruminal foi 6,25.

4.3.2 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

Os dados referentes ao consumo e digestibilidade dos nutrientes são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Consumo e digestibilidade aparente dos nutrientes (%) no trato digestório total de ovinos alimentados com as dietas experimentais

tem	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P
	CTL	MON	AC100	AC200	AC300		
Consumo, kg/dia							
MS	1,74 ^a	1,44 ^b	1,75 ^a	1,80 ^a	1,78 ^a	0,06	0,02
MSPC	2,60	2,16	2,52	2,59	2,53	0,10	0,14
FDN	0,56 ^a	0,46 ^b	0,60 ^a	0,58 ^a	0,57 ^a	0,02	0,01
FDNPC	0,83	0,69	0,81	0,84	0,81	0,04	0,12
MO	1,64 ^a	1,36 ^b	1,66 ^a	1,70 ^a	1,68 ^a	0,06	0,02
PB	0,25 ^a	0,220 ^b	0,254 ^a	0,261 ^a	0,259 ^a	0,01	0,02
EE	0,05 ^b	0,043 ^c	0,054 ^{ab}	0,057 ^{ab}	0,058 ^a	<0,01	<0,01
CNF	0,77 ^a	0,645 ^b	0,784 ^a	0,802 ^a	0,794 ^a	0,03	0,02
Digestibilidade, %							
MS	76,76 ^b	80,74 ^a	75,95 ^b	75,81 ^b	73,23 ^b	0,74	0,01
FDN	88,60	88,83	87,11	87,68	87,15	0,45	0,65
MO	78,69 ^b	82,44 ^a	77,81 ^{bc}	77,73 ^{bc}	75,38 ^c	0,70	0,01
PB	80,49	82,40	77,28	76,45	75,76	1,15	0,08
EE	61,69	72,55	63,16	68,20	70,84	2,00	0,51
CNF	72,13 ^b	78,48 ^a	72,31 ^b	71,64 ^b	68,50 ^b	0,94	<0,01

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural); AC100 = (10.0 g de óleo essencial ACTIVO®/ 100 kg de matéria natural); AC200 = (20.0 g de óleo essencial ACTIVO®/ 100 kg de matéria natural); AC300 = (30.0 g de óleo essencial ACTIVO®/ 100 kg de matéria natural).² EPM = erro padrão da média
MS = matéria seca; MSPC = matéria seca em % peso corporal; FDNCP = consumo de FDN em % do peso corporal; FDN = fibra solúvel em detergente neutro; MO = Matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; CNF = carboidratos não fibrosos = 100-(PB+EE+FDN+cinzas)

Os consumos de MS; FDN; MO; PB; EE; CNF do tratamento MON foram inferiores aos demais tratamentos. Não houve efeito no consumo de matéria seca e de FDN em percentagem do peso corporal (Tabela 3).

A redução no CMS no tratamento MON está de acordo com Nagaraja et al. (1997), que mostraram que ionóforos como monensina foram capazes de reduzir o CMS kg/dia em até 4,0%. Segundo Moraes, Berchielli e Reis, (2011), esta redução no CMS kg/dia causado pela monensina é atribuída ao sabor desagradável desse produto e ainda devido ao aumento na concentração de C₃ em relação ao C₂, onde o C₃ é essencial ao metabolismo energético dos ruminantes, reduzindo o incremento calórico.

Os mecanismos de redução do consumo de matéria seca com monensina não são bem entendidos. O que pode-se observar é que o NRC (1996) concluiu que para que o consumo estimado seja reduzido em 4,0%, deve-se utilizar monensina nas doses de 27,5 e 33 ppm, o que está próximo a concentração utilizada no presente estudo (25,0 ppm), e também atribui-se a este efeito, o sabor desagradável da monensina.

Os dados do presente estudo não estão de acordo com Targer e Krause (2011) que ao avaliarem óleos essenciais nos compostos de cinamaldeído, eugenol e pimenta (mesmos compostos presentes no ACTIVO®), não verificaram efeitos sobre o CMS (kg/dia) e digestibilidade dos nutrientes.

Houve efeito ($P = 0,01$) na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica ($P = 0,01$) e CNF ($P < 0,01$) que foi 7,0%, 6,0% e 10,0% superior para MON em relação aos demais tratamentos, respectivamente, (Tabela 3). Houve tendência ($P = 0,08$) na redução da digestibilidade da proteína bruta para o tratamento CTL e doses de óleo. Não houve efeito para digestibilidade da FDN e do extrato etéreo (Tabela 3). A melhoria nas digestibilidades da MO e CNF para o tratamento MON pode ser explicada quando, da inclusão de monensina, ocorre seleção na população microbiana do rúmen, maior estímulo às bactérias Gram negativas que são utilizadoras do ácido láctico, além do estímulo à maior captação de oxigênio do ambiente ruminal como também, melhoria na atividade da amilase ruminal (WEIDMEYER et al., 1987).

A menor digestibilidade dos nutrientes para CTL e ACTIVO® podem ser explicadas pelo maior CMS (kg/dia), o que pode ter causado aumento na taxa de passagem. Explicando este aumento de consumo nos tratamentos CTL e ACTIVO®, pode-se inferir que a única maneira de ter aumentado a ingestão para estes tratamentos em relação à MON, foi pelo aumento do volume ruminal, isto é, aumentando a quantidade de digesta no rúmen (POPPI et al., 2000).

Outro fato que pode ser observado no presente estudo, é a tendência de o tratamento MON ter tido maior digestibilidade da proteína bruta no trato total, visto que a literatura cita como um dos principais efeitos deste composto a redução na degradação ruminal da proteína dietética (RUSSEL, 2002).

Outros autores Benchaar et al. (2007b,a), testaram duas doses, 0 e 750 mg/d de uma mistura de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno cinamaldeído para vacas em lactação, não observaram efeito na digestibilidade da matéria seca, proteína bruta, fibra insolúvel em detergente neutro, fibra insolúvel em detergente ácido e

amido, respectivamente. Da mesma forma, a digestibilidade dos nutrientes não foi afetada em vários estudos (MALECKY et al., 2009; MEYER et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Testando baixas concentrações (0,5 g/d) ou altas (1,0 g/d) de uma combinação de compostos ativos de óleos essenciais (eugenol, carvacrol, citral e cinamaldeído) e outro tratamento com 1 g/d da combinação de óleo essencial de orégano, cinamaldeído e limão Lin et al. (2013), não observaram diferenças na digestibilidade da MS, FDN e FDA entre os tratamentos, porém houve redução na digestibilidade da PB para os três tratamentos que incluíram as misturas de óleos essenciais.

Anassori et al. (2011) não verificaram efeito na digestibilidade da matéria orgânica quando da inclusão de óleo essencial de alho. Porém, verificaram aumento na digestibilidade da FDN quando da inclusão deste óleo essencial em comparação com a dieta base.

4.3.3 Balanço de nitrogênio

Houve efeito ($P = 0,02$) no consumo de N (g/dia), onde o menor consumo foi observado no tratamento MON que foi de 10,0% e 19,0% menor que os tratamentos CTL e doses de ACTIVO®, respectivamente. Houve tendência de efeito ($P = 0,09$) na excreção diária de N nas fezes (g/dia), que variou de 9,82 g/dia para o tratamento AC200 a 5,96 g/dia para MON (Tabela 4).

O menor consumo de N (g/dia) no tratamento MON pode ser explicado pelo menor CMS (kg/dia) em relação aos demais, porém observou-se maiores excreções diárias de N na urina g/dia para os tratamentos MON e 200 ACTIVO®, o que mostra que para estes tratamentos, houve menor aproveitamento do nitrogênio em relação aos demais, ou seja, menor N retido g/dia.

A ingestão de N variou de 33,63 g/dia para MON a 41,79 (g/dia) para o tratamento AC200.

Tabela 4 - Balanço de nitrogênio em ovinos alimentados com dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de p
	CTL	MON	AC100	AC200	AC300		
N ingerido, g/dia	40,43 ^a	33,63 ^b	40,70 ^a	41,79 ^a	41,41 ^a	1,32	0,02
N fezes, g/dia	7,77	5,96	9,00	9,88	8,34	0,51	0,09
N urina, g/dia	10,31	11,06	8,96	11,92	7,31	1,29	0,69
N retido	22,35	16,61	22,74	19,99	26,25	1,63	0,09
DAP ³ , %	0,80	0,82	0,77	0,76	0,77	0,01	0,44
CND ⁴ , g/dia	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	<0,01	0,45
% N retido em relação ao consumido	53,44	48,65	55,02	46,40	64,21	3,16	0,16
% N retido em relação ao digerido	66,50	59,39	71,57	61,65	80,54	4,19	0,23

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural); AC100 = (10.0 g de óleo essencial comercial ACTIVO® / 100 kg de matéria natural); AC200 = (20.0 g de óleo essencial comercial ACTIVO® / 100 kg de matéria natural); AC300 = (30.0 g de óleo essencial comercial ACTIVO® / 100 kg de matéria natural).² EPM = erro padrão da média; ³ DAP = digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio; ⁴CND = consumo de nitrogênio digestível

Em relação ao menor consumo de N (g/dia), observou-se menor excreção fecal de N (g/dia) no tratamento MON, porém maior excreção diária na urina. Segundo Van Soest (1994) mesmo com menor consumo de N (g/dia), a maior excreção urinária de N (g/dia) é indicio de baixa capacidade de utilização deste nutriente pelo fígado causando maior excreção na urina.

4.4 CONCLUSÕES

Não houve efeito dos tratamentos sobre a concentração ruminal de ácido graxo de cadeia curta. Maiores consumos de nutrientes e menores digestibilidade foram observados nos tratamentos que receberam as doses de óleo essencial quando comparados aos que receberam monensina.

As doses utilizadas neste estudo não foram capazes de surtir efeitos positivos nem negativos em relação aos parâmetros de fermentação ruminal. Somente para amônia ruminal, observou-se aumento significativo quando da utilização de ACTIVO® em relação aos tratamentos MON e CTL.

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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 15thed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1141 p.
- 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. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228. 2008a.
- 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**, v. 87, p. 413-419, 2007a.
- BUSQUET, M. S.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 761-771, 2006.
- CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, A. F.; KAMEL, C. Effects of natural plants extracts on protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3230-3236, 2004.
- CASTILEJOS, 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.
- CHAVES, A. V.; STANFORD, K.; DUGAN, M. E. R.; GIBSON, L. L.; McALLISTER, T. A.; VAN HERK, F.; BENCHAAAR, C. Effects of cynamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites growth performance and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 17, p. 215-224, 2008.
- 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
- 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.

GROBNER, M. A.; JOHNSON, D. E.; GROOBAL, S. R.; BENZ, D. A. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. **Journal Animal Science**, v. 33, p. 64-66, 1982.

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.

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.

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

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**, v. 154, 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.

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

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. AND DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. FALTA local: Editora, 1997. p 523-632.

NUSSIO, L. G.; De CAMPOS, F. P.; LIMA, L. L. M. Metabolismo dos carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI: **Nutrição de ruminantes**. FALTA local: editora, 2011. p. 616.

POPPI, D. P.; FRANCE, J.; McLENNAN, S. R. Intake, passage and digestibility. In: THEODOROU, M. K.; FRANCE, J. (Ed.). **Feeding system and feed evaluation Models**. CAB International, p. 35-52, 2000.

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

SANTOS, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Effects of addition of an essential oil complex to the diet lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 64-71, 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute. **Sas system for windows.** version 9. Cary: SAS, 2002.

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

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.

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

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.

WEIDMEYER, R. D.; ARAMBEL, M. J.; WALTERS, J. L. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2063-2068, 1987.

YANG, W. Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B. N.; BEUCHEMIN, K. A. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 57-64, 2010a.

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

6 EXPERIMENTO II: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ALTO CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM CIDREIRA (*Cymbopogon citratus*)

RESUMO

Os objetivos deste experimento foi avaliar o efeito da inclusão de doses do óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) sobre a fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio. Os tratamentos experimentais foram: controle negativo (sem óleo essencial); controle positivo (adição de 25 ppm de monensina sódica); 1,25 (1,25 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta); 2,50 (2,50 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta); e 3,75 (3,75 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta). Trinta borregos castrados da raça Santa Inês x Dorper canulados no rúmen com $45,6 \pm 10,7$ kg de peso corporal foram distribuídos em delineamento experimental tipo blocos completos casualizados com seis repetições por tratamento. Não houve efeito de tratamento na concentração de acetato, mas observou-se forte tendência de efeito de dia ($P = 0,06$) sobre a diminuição na concentração de propionato. Houve aumento ($P = 0,02$) com o passar dos dias, na concentração de C_4 nos tratamentos com óleo essencial de capim cidreira. Houve tendência de efeito de dia ($P = 0,07$) em aumentar a relação acetato/propionato quando da adição do óleo essencial de capim cidreira. Houve forte tendência ($P = 0,06$) de efeito de tratamento na concentração de Isobutirato, como também efeito de dia ($P = 0,03$), aumentando até o último dia a concentração deste isoácido. Observou-se efeito de dia ($P = 0,01$) para aumento na concentração de isovalerato. Não foi observado efeito de tratamento na concentração de $N-NH_3$ ruminal. Porém, houve efeito de dia ($P < 0,01$) para esta variável, sem efeito de interação. Não houve efeito de tratamento para pH ruminal, porém, observou-se efeito de dia ($P < 0,01$) e interação tratamento x dia ($P = 0,03$). Não houve efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo no presente estudo. Houve forte tendência ($P = 0,06$) de efeito na digestibilidade da matéria seca ($P = 0,04$), na digestibilidade da proteína bruta para os tratamentos MON e doses de óleo essencial de capim cidreira e, ausência de efeito para as demais variáveis estudadas. Não Houve efeito sobre o consumo de nitrogênio, excreção de nitrogênio na urina,

nitrogênio retido. Houve forte tendência ($P = 0,07$) na excreção de nitrogênio nas fezes (g/dia) em que houve menor excreção para os tratamentos MON e doses de óleo essencial de capim cidreira em relação ao CTL. Houve efeito ($P = 0,04$) sobre digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio sendo maiores para MON e doses de óleo essencial de capim cidreira.

Palavras-chave: Óleo essencial. Fermentação ruminal. Digestibilidade Balanço de nitrogênio. Ovinos, Capim cidreira.

ABSTRACT

The objectives of this experiment were to evaluate the effects of levels of inclusion of Lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) in rumen fermentation parameters, nutrients digestibility and nitrogen balance. The treatments were: Negative control (no essential oil); Positive control (addition of 25 ppm of monensin); 1.25 (1.25 mL essential oil / kg of diet as fed); 2.50 (2.50 mL of essential oil / kg of diet as fed); and 3.75 (3.75 mL of essential oil / kg of diet as fed). Thirty crossbreed Santa Ines x Dorper lamb cannulated in the rumen with 45.6 ± 10.7 kg of body weight were allocated into randomized complet blocks design with six replicates per treatment. The was no effect on acetate concentration among treatments, but there was a strong tendency of day effect ($P = 0.06$) to decrease the concentration of propionate. Increasing ($P = 0.02$) with time, the concentration of butirate in the treatments with essential oil of lemongrass. There was trend of effect of day ($P = 0.07$) to increase acetate / propionate ratio when essential oil of lemon grass was added. There was a strong trend ($P = 0.06$) of effect of treatment in the concentration of Isobutyrate as well, day effect ($P = 0.03$) increase until the last day the concentration of this isoácido. It was observed that effect of day ($P = 0.01$) increased the concentration isovalerate. There was no treatment effect in the concentration of ruminal $N-NH_3$. However, there was effect of day ($P < 0.01$) for this variable without interaction effect. Treatments had no effect in ruminal pH, however, it was observed effect of day ($P < 0.01$) and treatment x day interaction ($P = 0.03$). There was no effect for all variables related to intake in this study. However, there was a trend ($P = 0.06$) of effect on dry matter digestibility for the treatments MON and essential oil doses, effect ($P = 0.04$) for the digestibility of crude protein for teratments MON and essential oils doses in comparision of CTL, and no

effect for the other variables. There was no effect for nitrogen intake, nitrogen excretion in the urine, retained nitrogen. There was a strong trend ($P = 0.07$) in nitrogen excretion in faeces for MON and essential oil doses. There was an effect ($P = 0.04$) for apparent digestibility of nitrogen sources for MON and essential oil doses.

Key words: Essential oil. Rumen fermentation. Digestibility. Nitrogen balance. Sheep. Lemongrass

6.1 INTRODUÇÃO

Alguns óleos essenciais possuem capacidade semelhante aos ionóforos em atuar seletivamente sobre as populações microbianas do

rúmen (Calsamiglia et al., 2007), alterando o padrão fermentativo, reduzindo a relação $C_2:C_3$ e a produção de metano, o que torna o rúmen energeticamente mais eficiente. As vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H^+ , além de não produzi-lo como observado nas rotas que levam à produção de acetato e butirato (Van Soest, 1994). Logo, maximizar a produção de propionato é competir com as metanogênicas por substrato.

Os ionóforos são os aditivos comerciais mais utilizados no mundo visando manipular a fermentação ruminal e melhorar a eficiência alimentar de animais ruminantes. São altamente efetivos contra bactérias Gram-positivas, podendo existir pouca ou nenhuma atividade em bactérias Gram-Negativas devido sua membrana externa possuir porinas (canais de proteína) com um tamanho limite de aproximadamente 600 Dáltons (Da), enquanto que a maioria dos ionóforos possuem tamanho maior que 600 Da, o que faz com que os mesmos não consigam atravessar as membranas deste grupo de bactérias (NAGARAJA et al., 1997; RUSSEL; STROBEL, 1989).

A União Europeia, em 2006, proibiu a utilização de antibióticos como os promotores de crescimento, incluindo nessa classe os ionóforos. Esta determinação foi principalmente devido à saúde pública (EUROPEAN UNION, 2003). Com isso, a comunidade científica tem estudado propriedades antimicrobianas dos compostos secundários dos vegetais que possam reproduzir os benefícios dos ionóforos.

O *Cymbopogon citratus*, popularmente conhecido como capim limão, capim santo ou capim cidrão, é originário da Ásia, internacionalmente chamado de capim limão da Índia Ocidental (*West Índia Lemongrass*) de uso muito popular no Brasil. É conhecido por suas propriedades ansiolíticas e anti-hipertensivas (LORENZI, 2002).

A população utiliza como chá abafado de suas folhas, como calmante, digestivo, estomático, em dores de cabeça, dentre outras. Devido às propriedades antimicrobianas apresentadas pelo óleo, vários trabalhos vêm testando sua eficácia na atividade antibacteriana e antifúngica (SCHUK et al., 2001).

O principal componente de seu óleo essencial é o citral, que é composto pela mistura de isômeros neral (β -citral) e geranial (α -citral) (LEAL et al., 2003). São também encontrados em seu óleo essencial o geraniol, limoneno, citronelal e mirceno (GUERRA et al., 2000).

Vários são os trabalhos que comprovam a ação antimicrobiana de alguns óleos essenciais, inclusive com a evidência de que bactérias Gram-positivas foram mais sensíveis do que as Gram-negativas (GUERRA et al., 2000; ZAGO et al., 2009; NAIK et al., 2010).

Araujo (2010), em sistema *in vitro*, observou aumento na concentração de C₂ em relação ao tratamento controle para as duas doses de capim cidreira utilizadas no estudo (75 e 150 μ L). Observou aumento na concentração de C₃ somente para a dosagem de 75 μ L, reduzindo a concentração do mesmo para a dosagem mais alta, 150 microlitros. Assim sendo, os objetivos deste experimento foram avaliar os efeitos de teores de óleo essencial de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) sobre os parâmetros da fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio em ovinos.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas instalações 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, localizada em Piracicaba – SP (22° 42’ 24” S e 47° 37’ 53” O), Brasil.

6.2.1 Animais e instalações

Animais providos com cânulas ruminais foram alojados individualmente em baias no período dos dias zero ao dia 18 e, em seguida, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas para ensaios de metabolismo com dimensões de 1,30 x 0,55 m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina (Figura 2).

Figura 2 - Animais com arreio para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas

Fonte: Arquivo pessoal

6.2.2 Delineamento experimental

Trinta borregos castrados F1 (Dorper x Santa Inês) canulados no rúmen com peso médio de $45,6 \pm 10,7$ kg e aproximadamente seis meses de idade foram utilizados no experimento. O período experimental teve duração de 23 dias, sendo 18 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais, quatro dias para a determinação do CMS, colheita de fezes e urina, e um dia (23º) para colheita de conteúdo ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental em blocos completos casualizados (6 blocos e 5 tratamentos). Em todos os tratamentos os animais foram alimentados com uma dieta base (90% concentrado e 10% de volumoso) e os tratamentos experimentais foram: 1) Controle (dieta base, sem adição

de óleo essencial e sem monensina sódica); 2) Dieta base adicionada com 1,09 mL de óleo de Capim Cidreira/kg de matéria seca ou 1,25 mL/kg de matéria natural; 3) dieta base e 2,18 mL de óleo de Capim Cidreira/kg de matéria seca ou 2,50 mL/kg de matéria natural; 4) Dieta base e 3,27 mL de óleo de Capim Cidreira/kg de matéria seca ou 3,75 mL/kg de matéria natural e, 5) Dieta base e Rumensin 200 (Monensina sódica 25 mg/kg de matéria seca).

6.2.3 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 1 cm. Em seguida, foram misturados ao farelo de soja, milho moído, calcário, mistura mineral e, no caso do controle positivo, a monensina sódica (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 foram adicionados na dieta total no momento da oferta. O Rumensin 200 foi misturado na ração (12,5 g/100 kg, com o auxílio do misturador mencionado acima).

Todos os dias do período experimental as rações foram pesadas em balança eletrônica de precisão e ofertadas *ad libitum* 2 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.

6.2.4 Colheita e análises de amostras de conteúdo ruminal

Nos dias 0 (dia anterior ao início do fornecimento das dietas experimentais), 7, 14 e 21 foi colhido conteúdo ruminal e as colheitas foram realizadas nas horas zero (antes do fornecimento da ração), 3, 6 e 9 horas após o arraçoamento do período da manhã. Logo após a colheita, as amostras foram filtradas em tecido de nylon, sendo em seguida realizada a medição imediata do pH em potenciômetro digital (DIGIMED® DM20). Do fluido filtrado foram retiradas duas alíquotas de 25 mL e foram

imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C para posterior determinação da concentração de AGCC e N amoniacal.

6.2.5 Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes

Depois de descongeladas, as amostras das rações ofertadas, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Em seguida, todas as amostras 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 orgânica (MO) foi obtida por meio da incineração da amostra em forno 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). O teor de extrato etéreo foi determinado utilizando um aparelho Leco TFE2000 (LECO® Corp.). A concentração de FDN foi determinada conforme (Van Soest, 1992), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom A2000 (Ankom Tech. Corp., Macedon, NY). A concentração de nitrogênio total das amostras de urina foi determinada pelo método Microkjeldahl (AOAC, 1997).

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total foi calculada subtraindo-se da quantidade consumida de cada nutriente a excreção fecal do respectivo nutriente. O N retido foi calculado pela diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina, o N retido foi expresso em % do N consumido e em % do N digerido.

As proporções dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais encontram-se na (Tabela 5) em que, o tratamento CTL foi acrescido de monensina sódica ou respectivas doses do óleo essencial de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*).

Tabela 5 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais (% da MS)

Item	Dietas ¹				
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27
Ingredientes					
Feno “coastcross”	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de soja	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
Milho moído	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0
Cloreto amônio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcáreo	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
Mistura mineral ²	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Óleo essencial (mL/100 kg MS)	0	0	109,0	218,0	327,0
Monensina sódica (ppm)	0	25,0	0	0	0
Composição química					
MS (% da MO)	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5
Matéria orgânica	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
Proteína bruta	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7
Extrato etéreo	2,83	2,83	2,83	2,83	2,83
FDN ³	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de Monensina sódica 25 mg/kg de MS); 1,09 = (109 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS); 2,18 = (218 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS); 3,27 = (327 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS).

²composição: Ca 13,4%, P 7,5%, Mg 1%, S 7%, Cl 21,8%, Na 14,5%, Mn 1100 mg/kg, Fe 500 mg/kg, Zn 4600 mg/kg, Cu 300 mg/kg, Co 40 mg/kg, I 55 mg/kg, Se 30 mg/kg.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro

6.2.6 Composição do óleo essencial de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*)

A composição do óleo essencial de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) foi determinada no laboratório de Química e análise de alimentos da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz da Universidade de São Paulo em cromatógrafo equipado com coluna RTX 5MS com 30 m de comprimento e 0,25 mm de espessura com temperatura inicial de 40 °C por 8 minutos (rampa 1) aumentando 3 °C por minuto até 180 °C (rampa 2) e 20 °C até 230 °C (rampa 3) por um período total de 77,17 minutos (Tabela 6).

Tabela 6 - Composição do óleo essencial de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*)

Composto	Capim cidreira
	% Relativa
α pineno	0,64
Canfeno	3,42
5 hpeten 6 metil	4,08
Limoneno	0,80
Nonanone	1,52
Rose furan	0,62
Linalol	1,78
α 2 dimetil	0,77
β citronelal	0,76
Oxido furan	1,16
Isogeranial	1,03
2,6 octadienal 3,7 dimetil	31,94
Garaniol	0,80
Geranial	41,43
Citroneli acetone	0,86
Eugenol	0,97
α 2 capaeno	0,68
Neril acetate	0,46
β cariofileno	3,31
Oxido cariofileno	1,88
Não identificados	1,09

6.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Após o período de adaptação, nos dias 19, 20, 21 e 22, às 7:00 horas da manhã, a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foram mensurados. As fezes foram pesadas em balança de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, diariamente foram colhidas amostras das fezes e da urina diária. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos coletores das gaiolas em vasilhames contendo ácido clorídrico 6N, 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 medido o consumo de ração. Com base no consumo diário de ração foi realizada a oferta do dia posterior, de modo que as sobras não fossem superiores a 10% da quantidade ofertada, sendo colhida amostras das mesmas no último dia para análises bromatológica, visando determinar a digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Todos os animais foram pesados, no primeiro e no último dia de cada período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

6.2.8 AGCC e N-amoniacal

Para determinação dos AGCC; 1,2 mL de fluido ruminal adicionado com 0,3 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) foram centrifugados (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) por 30 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 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-NH₃ foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (BIO – RAD, Hercules, CA), utilizando-se filtro para absorbância de 550 nm.

6.2.9 Análise estatística

Os dados de características de fermentação ruminal do Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (2002). As médias de cada tratamento foram obtidas utilizando o comando LSMEANS, sendo o efeito de dia analisado através da comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. A interação tratamento vs dia também foi avaliada na análise de variância e, quando significativa, foi desdobrada através de comparação de médias utilizando o teste de

Tukey com significância de 5%. Foi estabelecido nível aceito para tendência entre 5 e 10%. Os efeitos de semana e interação dieta x semana foram definidos pelo teste F da análise de variância.

Os dados de consumo, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados utilizando o procedimento “MIXED” do SAS (2002). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. Os efeitos foram declarados significativos quando $P < 0,05$. O modelo estatístico utilizado para análise dos dados de consumo e digestibilidade dos nutrientes é o que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + E_{ij}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco acaso ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5) e E_{ij} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

Os dados de características fermentação ruminal foram analisados conforme o modelo que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + S_{ij} + T_k + (DT)_{jk} + E_{ijk}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5), S_{ij} = erro residual associado ao efeito do animal (blocos x dieta), T_k = efeito de dia ($k = 1$ a 5), $(DT)_{jk}$ = interação entre dieta x dia e E_{ijk} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Parâmetros ruminais

Não houve efeito de tratamento sobre as características de fermentação ruminal (Tabela 7). Esta ausência de efeito pode ser explicada pela ausência de efeito nos consumos dos nutrientes e digestibilidade dos mesmos para o dia 21 especificamente, visto que a quantificação da digestibilidade dos nutrientes é uma das variáveis mais importantes no que diz respeito ao aporte de nutrientes para os animais (FIRKINS et al., 1998).

Pode-se observar na tabela 7, em relação à ausência de efeito de tratamento para todas as variáveis ruminais, apenas tendência ($P = 0,06$) de aumento da concentração de isobutirato observada para os tratamentos que receberam dosagens do óleo essencial de capim cidreira. Estes dados mostram que os tratamentos MON e doses de óleo essencial de capim cidreira não foram efetivos em atuar sobre a população microbiana Gram negativa do rúmen em relação a concentração de C_2 ,

mas observa-se tendência para efeito de dia ($P = 0,06$) para diminuição na concentração de C_3 , o que é indício de que a população microbiana Gram negativa do rúmen ter sido mais sensível aos tratamentos MON e doses de óleo essencial de capim cidreira em relação às Gram positivas e, pode ter ocorrido redução da carboxilação do oxaloacetato pela diminuição da enzima piruvato carboxilase e também, inibição da atividade da enzima malato desidrogenase (Kozloski, 2011). Mais uma vez, esse fato pode ser observado com aumento ($P = 0,02$) com o passar dos dias na concentração de C_4 para os tratamentos com de óleo essencial de capim cidreira, favorecendo a multiplicação e crescimento de Gram positivas em relação a Gram negativas, como *Ruminobacter amylophilus*, *Selenomonas ruminantium*, *Eubacterium ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*, que utilizam, amido, lactato, malato e açúcares diversos, aminoácidos, tendo como principais produtos de fermentação C_2 e C_4 (BERCHIELLI, 2011).

Tabela 7 - Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as experimentais

Item	Dia	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de p		
		CTL	MON	1,09	2,18	3,27		Trat	Dia	Trat vs Dia
AGCC, mM/100 mM										
Acetato, %	7	52,78	53,76	53,37	51,25	48,98	1,13	0,98	0,41	0,11
	14	50,13	47,21	53,31	52,16	52,00	1,03			
	21	50,76	53,20	50,98	52,14	55,36	0,85			
Média		51,22	51,39	52,55	51,85	52,11				
Propionato, %	7	33,31	37,16	32,88	37,94	41,14	1,74	0,71	0,06	0,20
	14	38,34	44,42	32,62	36,11	34,33	1,95			
	21	35,85	34,57	32,83	31,76	29,23	1,49			
Média		35,83	38,72	32,80	35,27	34,90				
Isobutirato, %	7	0,68	0,54	0,90	0,56	0,54	0,05	0,06	0,03	0,19
	14	0,71	0,64	0,91	0,76	0,95	0,05			
	21	0,72	0,77	0,99	0,87	0,83	0,04			
Média		0,70	0,65	0,93	0,73	0,77				
Butirato, %	7	9,80	5,64	8,89	7,65	6,53	0,79	0,49	0,02	0,35
	14	7,11	4,89	9,28	8,10	9,07	0,79			
	21	9,03	8,52	8,85	12,00	11,13	0,71			
Média		8,65	6,35	9,00	9,25	8,91				
Isovalerato, %	7	1,36	0,91	1,88	2,18	1,95	0,12	0,63	0,01	0,64
	14	1,76	1,28	2,06	1,54	2,26	0,18			
	21	1,78	1,51	1,71	1,78	1,74	0,20			
Média		1,63	1,23	1,88	1,50	1,88				
Valerato, %	7	1,42	1,63	1,78	1,25	1,88	0,09	0,41	0,12	0,14
	14	1,56	1,57	1,53	1,64	2,09	0,08			
	21	1,46	1,44	1,64	1,47	1,61	0,09			
Média		1,48	1,55	1,65	1,45	1,86				
Acetato:propionato	7	1,74	1,36	1,94	1,40	1,24	0,12	0,61	0,07	0,23
	14	1,47	1,37	1,98	1,60	1,58	0,14			
	21	1,55	1,66	1,97	1,71	2,01	0,10			
Média		1,59	1,46	1,96	1,57	1,61				
AGCC TOTAL, Mm/L	7	134,78	138,92	121,10	149,26	132,74	4,91	0,14	<0,01	0,86
	14	114,36	108,60	85,35	108,24	98,82	4,50			
	21	118,55	113,58	108,31	116,42	108,95	3,08			
Média		122,56	120,37	104,92	124,64	113,50				
N-NH3 mg/dL	7	16,61	15,56	16,69	15,84	15,03	0,50	0,28	<0,01	0,86
	14	14,93	16,62	19,77	16,48	16,48	0,62			
	21	18,10	17,85	21,46	18,72	18,28	0,65			
Média		16,55	16,68	19,31	17,01	16,60				
pH	7	6,14 ^a	6,02ab	6,02ab	6,06ab	5,95b	0,04	0,68	<0,01	0,03
	14	5,99b	6,03bc	6,16abc	6,31a	6,20ab	0,09			
	21	5,76	5,81	5,71	5,63	5,63	0,05			
Média		5,96	5,95	5,96	6,00	5,93				

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de Monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural); 1,09 = (109 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS); 2,18 = (218 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS); 3,27 = (327 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS).

² EPM = erro padrão da média.

Figura 3 - Variação no pH ruminal ao longo dos dias experimentais

Fonte: Dados da pesquisa

Outra observação que pode ser feita é devido a tendência de efeito de dia ($P = 0,07$) em aumentar a relação $C_2:C_3$ quando da adição do óleo essencial de capim cidreira, o que confirma mais uma vez a capacidade desse óleo atuar inibindo a população de microrganismos Gram negativos no rúmen. Houve tendência ($P = 0,06$) de efeito de tratamento sobre aumento na concentração de Isobutirato que se refere ao catabolismo do aminoácido valina. Isto pode ser explicado devido a maioria dos óleos essenciais já testados serem efetivos em aumentar este isoácido no rumen, como também, efeito de dia ($P = 0,03$) aumentando até o último dia a concentração deste isoácido. Pode-se observar efeito de dia ($P = 0,01$) para aumento na concentração de isovalerato para CTL, que variou de 1,36 a 1,78, MON de 0,91 a 1,51 e, para os tratamentos com teores do óleo essencial de capim cidreira, observou-se aumento até o 14º dia, reduzindo as concentrações deste isoácido no dia 21. Este fato pode ter sido causado devido ao aumento no catabolismo da leucina (VAN SOEST, 1994).

Observou-se efeito clássico da atuação da monensina na redução da relação $C_2:C_3$, com aumento na concentração de C_3 da ordem de 8,0% ao se comparar MON vs CTL e aumento de 12,0% ao se comparar MON vs óleo essencial de capim cidreira, sem alterar a concentração de acetato. Vale ressaltar que este efeito também depende do tipo de dieta, onde 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 baixa, ao redor de 1:1 (RUSSEL, 2002).

O principal componente do óleo de canela (cinamaldeído) foi eficiente em aumentar a relação $C_2:C_3$ quando incubado em meio de cultura em pH 7,0. Já em incubação em meio de cultura com pH 5,5, foi observado redução na relação $C_2:C_3$, (CARDOZO et al., 2005).

Cardozo et al. (2004) ao avaliarem o óleo essencial de pimenta não encontraram efeito na concentração individual dos AGCC. Estes dados estão de acordo com o presente estudo e estes mesmos autores encontraram efeito somente para a concentração de valerato. Estes mesmos autores observaram que durante o período de adaptação, os óleos essenciais de cinamaldeído, alho, anis e orégano reduziram a proporção molar de C_2 , C_3 e C_4 entre os dias dois e seis de fermentação, não havendo diferença após o dia seis. Porém, para C_4 no presente estudo, verificou-se aumento na concentração molar deste AGCC após o dia sete até o dia 21. Estes resultados mostram que estes aditivos possuem efeito de curto prazo na fermentação microbiana ruminal e que a adaptação ocorreu após seis dias (CARDOZO et al., 2004).

Anassori et al. (2011) encontraram redução na concentração de C_2 entre os dias quatorze e vinte um ao compararem palha de alho, óleo essencial de alho e monensina contra o tratamento controle (sem aditivos), porém, efeito de tratamento, não foi observado no presente estudo. Os mesmos autores também verificaram que a adição de palha de alho e óleo essencial de alho causou aumento na concentração de C_4 nos dias quatorze e vinte um, o que também pode ser observado no presente estudo para esta variável.

Os dados do presente estudo estão de acordo com Tekype et al. (2013) que, trabalhando com vacas em lactação testando óleo essencial comercial (525 mg/vaca/dia) comparado com tratamento controle (sem aditivo), não verificaram efeito na concentração de ácidos graxos de cadeia curta total. Porém, observaram efeito nas concentrações de isobutirato e isovalerato, como ocorreu no presente estudo. Neste contexto, verifica-se a eficácia de alguns óleos essenciais em atuar na deaminação dos aminoácidos valina e leucina, respectivamente.

Não foi observado efeito de tratamento na concentração de $N-NH_3$ ruminal (Tabela 7). Houve efeito de dia ($P < 0,01$) para esta variável, sem efeito de interação. Confirmando o aumento nas concentrações de isobutirato e isovalerato, pode-se observar para $N-NH_3$ aumento nas concentrações quando da adição do óleo essencial

de capim cidreira. Mesmo com ausência de efeito para concentração de N-NH₃ ruminal, observa-se no presente estudo que nos tratamentos com óleo essencial de capim cidreira, as concentrações de N-NH₃ foram superiores 16,0; 3,0 e 1,0% em relação ao tratamento CTL e 17,0; 5,0 e 2,0% superiores em relação ao tratamento MON.

A diminuição na concentração de amônia ruminal pode ser indicativo de aumento da síntese de proteína microbiana quando do correto balanço de energia no rúmen. Já, se a taxa de deaminação excede a taxa de utilização de amônia para a síntese de proteína microbiana, pode ocorrer perda para a síntese de proteína microbiana (Tedeschi et al., 2000). Porém, alguns autores recomendam concentração de amônia ruminal para máximo desaparecimento de substrato de 24 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).

Fraser et al. (2007) não observaram efeito na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen quando trabalhavam com cinamaldeído na dosagem de 500 mg/L de conteúdo ruminal, o que mostra que este óleo essencial e o utilizado no presente estudo, exerce pouco ou nenhum efeito sobre bactérias produtoras de amônia ruminal.

A amônia ruminal é produzida a partir da degradação da proteína verdadeira do alimento, do nitrogênio não proteico ingerido, do nitrogênio reciclado na forma de ureia para o rúmen e da degradação ruminal de microrganismos mortos (VAN SOEST, 1994).

Os dados do presente estudo não estão de acordo com Tekype et al. (2013), que encontraram aumento significativo na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen quando da adição de óleo essencial comercial na dieta de vacas em lactação. Neste contexto, o autor concluiu que o aumento na concentração de amônia no rúmen foi devido à elevada taxa de degradação da proteína, além da amônia não ter sido eficientemente capturada para síntese de proteína microbiana.

Anassori et al. (2011), verificaram redução significativa nas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen quando da adição de óleo essencial de alho ou monensina, após o dia sete de coleta de conteúdo ruminal, o que não está de acordo com o presente estudo, que, pelo contrário, houve efeito de dia, mas com aumento nas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen para todos os tratamentos.

Não houve efeito de tratamento ($P > 0,05$) para pH ruminal, porém, observou-se efeito de dia ($P < 0,01$) e interação tratamento x dia ($P = 0,03$) para esta variável (Tabela 7 e Figura 3).

Desdobrando a interação, verificou-se que no dia 7 do período experimental, o pH ruminal dos animais que receberam a dieta contendo 3,27 mL de óleo essencial de capim cidreira foi superior ao dos animais do tratamento controle não havendo efeito neste dia para os animais que receberam os demais tratamentos (Tabela 7. Figura 3). O pH ruminal variou significativamente ao longo dos dias em que o tratamento CTL difere do tratamento 3,27 mL de óleo essencial de capim cidreira com médias de 6,14 e 5,95, respectivamente neste dia. O que pode ser explicado devido a dose mais alta de óleo essencial do capim cidreira ter tornado o ambiente ruminal mais ácido neste dia. Adicionalmente, no dia 14, a principal diferença foi observada para o tratamento 2,18 mL em relação ao CTL e MON.

Uma vez que o pH ruminal cai abaixo de 5,2 o crescimento do *Streptococcus bovis* é inibido, porém bactérias do gênero *Lactobacillus* encontram-se em ambiente favorável para sua multiplicação, onde continuam produzindo ácido láctico na faixa de pH abaixo de 5,2. Isto mostra que os dados de pH no presente estudo estão em margem de segurança em relação à acidose láctica, visto que a média para todos os tratamentos foi de 5,96 (RUSSEL; INO, 1985).

O menor pH ruminal para o tratamento 3,27 mL no dia 7 pode ser explicado devido ao período de adaptação a dietas com alto teor de concentrado. Este exerce uma pressão seletiva sobre os microrganismos sensíveis ao pH e, quando este é diminuído, bactérias amilolíticas e resistentes a acidez aumentam (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Outros autores, como Fraser et al. (2007) com cinamaldeído, Malecky et al. (2009) com mistura de monoterpenos, Wang et al. (2009) testando óleo essencial de orégano, não observaram efeito com adição de cinamaldeído sobre o pH ruminal.

Em três experimentos testando óleo essencial de alho ou palha de alho, Anassori et al. (2011) não encontraram efeitos de tratamento, nem efeito de dia para os valores de pH ruminal. Tekype et al. (2013) também não verificaram efeito no pH ruminal quando da inclusão de óleo essencial comercial na dieta de vacas em lactação. Neste contexto, para o dia 21 isoladamente, verifica-se comportamento inverso no que diz respeito ao pH ruminal e concentração de ácidos graxos de cadeia curta total. Estes dados estão de acordo com Chaves et al. (2008a) que trabalhavam com dietas com alto teor de concentrado para borregos e observaram redução marcante no pH ruminal e aumento na concentração de AGCC total com adição de carvacrol e cinamaldeído.

6.3.2 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

Os consumos de MS, MSPC (matéria seca por kg de peso corporal), MSPMET (matéria seca peso metabólico), FDN, FDNPC (fibra insolúvel em detergente neutro em percentagem do peso corporal), MO, PB e EE não foram influenciados pelos tratamentos (Tabela 8).

Os dados de consumo do presente estudo estão de acordo com Tekype et al. (2013), que suplementaram vacas em lactação com óleo essencial comercial e não verificaram efeito no consumo para nenhuma das variáveis.

Também, Benchaar et al. (2008) não verificaram efeito para nenhuma das variáveis de consumo quando suplementou vacas em lactação com 1 (g) de cinamaldeído por dia, confirmando mais uma vez que o óleo essencial de Capim cidreira (*Cymbopogon citratus*) não afeta o consumo dos nutrientes.

Tabela 8 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes por ovinos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					SEM ²	Valor de p
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
Consumo,kg/dia							
MS	1,34	1,23	1,26	1,27	1,22	0,04	0,85
MSPC	2,96	2,83	2,86	2,84	2,75	0,11	0,97
MSPC ^{0,75} (g/kg)	80,00	70,00	70,00	70,00	70,00	<0,01	0,84
FDN	0,19	0,18	0,18	0,18	0,18	0,01	0,80
FDNPC	0,44	0,40	0,42	0,41	0,40	0,02	0,85
MO	1,28	1,16	1,19	1,21	1,16	0,03	0,84
PB	0,21	0,19	0,20	0,20	0,19	0,01	0,80
EE	0,04	0,03	0,03	0,04	0,04	<0,01	0,64
Digestibilidade, %							
MS	79,80	84,80	85,05	82,63	83,41	0,67	0,06
FDN	79,99	81,03	80,74	78,01	81,69	0,81	0,63
MO	84,96	83,92	85,65	86,41	87,65	1,01	0,78
PB	76,15 ^b	82,79 ^a	82,54 ^a	79,14 ^{ab}	79,22 ^{ab}	0,82	0,04
EE	74,65	82,08	84,47	81,49	74,39	1,81	0,19

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural); 1,09 = (109 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS); 2,18 = (218 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS); 3,27 = (327 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de MS).

² EPM = erro padrão da média

Houve tendência ($P = 0,06$) de efeito na digestibilidade da matéria seca, efeito ($P = 0,04$) para a digestibilidade da proteína bruta nos tratamentos MON e 1,09 mL de óleo essencial de capim cidreira que foram superiores aos demais tratamentos, apresentando médias de 82,79 e 82,54%, respectivamente. Não verificou-se efeito para as demais variáveis estudadas (Tabela 8).

Pode-se observar aumento no CMS (kg/dia) para MON da ordem de 8,0% em relação ao CTL, 7,0% em relação às doses de óleo essencial. Estes dados estão de acordo com Nagaraja et al. (1997), que encontraram redução no CMS da ordem de 4,0% quando da utilização de ionóforos. As menores digestibilidades da PB no trato total e da MS no tratamento CTL pode ter sido causado pela maior taxa de passagem pelo trato digestório, visto que o aumento no CMS (kg/dia) consequentemente, aumenta a taxa de passagem (NRC, 1987; SANTOS; MENDONÇA, 2011).

Os dados do presente estudo estão de acordo com Yang et al. (2007) que forneceram 2 (g/dia) de óleo essencial de zimbro para vacas leiteiras e observaram aumento de 13,0% na digestibilidade da matéria seca em dieta com 40% de volumoso e 60% de concentrado. Porém, a digestibilidade da matéria orgânica, FDN e amido não foram afetadas pelos tratamentos. Eles sugerem que o aumento da digestibilidade ruminal foi devido ao aumento da digestão da proteína dietética em 11,0% quando comparado ao tratamento controle.

Malecky et al. (2009), ao trabalharem com cabras leiteiras, não verificaram efeito na digestibilidade para nenhum dos nutrientes quando utilizou uma mistura de monoterpenos 45,2% de linalol, 36,7 de p-cimeno, 16,0% de α -pineno e 2,2% de β -pineno. Da mesma forma, ao alimentarem ovelhas com dietas com alta concentração de proteína e 500 mg de ropadiar (composto por óleo de manjerição) não verificaram efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes KAZELOV et al., (2001). Ao avaliarem duas misturas de óleo essencial, composto por timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno em novilhos, Meyer et al. (2009) não verificaram efeito sobre a digestibilidade da MS e MO entre os tratamentos com média de 84,3% e 86,0%, respectivamente, confirmando que o óleo essencial de capim cidreira exerce pouca ou nenhuma atividade na digestibilidade dos nutrientes.

6.3.4 Balanço de nitrogênio

Não Houve efeito para consumo de nitrogênio (g/dia), excreção de nitrogênio na urina, nitrogênio retido ou consumo de nitrogênio digestível. Houve tendência ($P = 0,07$) na excreção de nitrogênio nas fezes (g/dia), onde no o tratamento CTL houve maior excreção (8,12 g/dia), MON 4,93 (g/dia) e para os tratamentos que receberam óleo essencial de capim cidreira apresentaram média de 6,18 g/dia. Estes dados mostram excreção fecal 40,0% menor para MON em relação ao CTL e 24,05 % inferior para os tratamentos que receberam óleos essenciais de capim cidreira em relação ao CTL. Verificou-se também que a excreção urinária de nitrogênio foi 32,0% menor para MON em relação ao CTL e 13,0% menor para os tratamentos que receberam óleos essenciais de capim cidreira em relação ao CTL (Tabela 9).

Tabela 9 - Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de p
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
N ingerido, g/dia	33,78	30,80	31,59	32,06	30,67	0,88	0,84
N fezes, g/dia	8,12	4,93	5,50	6,68	6,36	0,37	0,07
N urina, g/dia	11,01	7,51	9,05	9,27	10,37	1,20	0,89
N retido	14,65	15,52	17,04	16,10	13,94	1,27	0,96
DAP ³	76,15 ^b	82,79 ^a	82,54 ^a	79,14 ^{ab}	79,22 ^{ab}	0,82	0,04

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de Monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural); 1,09 = (109 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de matéria seca); 2,18 = (218 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de matéria seca); 3,27 = (327 mL de óleo essencial de Capim cidreira/100 kg de matéria seca).

² EPM = erro padrão da média;

³ DAP = digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio;

Houve efeito ($P = 0,04$) na digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio, sendo 8,0% maior para MON em relação a CTL e, 5,0% menor para CTL em relação aos tratamentos que receberam doses de óleo essencial de Capim cidreira. Estes dados mostram maior eficiência de utilização de nitrogênio para MON e óleo essencial de capim cidreira em relação ao CTL e estão de acordo com Van Soest (1994), os quais observaram que quando ocorre aumento no consumo de nitrogênio, aumenta também sua excreção urinária, reduzindo a eficiência de utilização do mesmo por bactérias do rúmen e consequentemente pelo animal.

6.4 CONCLUSÕES

Não houve efeito de tratamento para nenhuma das variáveis ruminais estudadas.

Observou-se aumento com passar dos dias para isobutirato, butirato e nitrogênio amoniacal no rúmen.

As dosagens de óleo essencial não afetaram consumo dos nutrientes.

A digestibilidade da proteína bruta aumentou quando da adição de monensina e óleos essenciais, sem alterar as demais variáveis relacionadas à digestibilidade.

A digestibilidade aparente do nitrogênio melhorou quando da presença dos aditivos, o que mostra que o óleo essencial de capim cidreira pode otimizar a utilização de nitrogênio em ovinos. A adição desses óleos essenciais podem aumentar a digestibilidade da proteína no trato total.

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.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.

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

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. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228. 2008a.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; DE OLIVEIRA, S. G. Fermentação ruminal. In: BERCHIELLI, **Nutrição de ruminantes. 2. ed.** Jaboticabal: Funep, 2011. p. 161–189.

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.

CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for the effects of natural plants extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2572-2579, 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.

CHAVES, A. V.; STANFORD, K.; GIBSON, L. L.; McALLISTER, T. A.; BENCHAAAR, C. Effects of carvacrol and cymaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance and carcass characteristics of growing lambs. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 145, p. 396-408, 2008a.

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; McLAREN, J. B. Occurrence of rumen ciliate *Oligosotrich bubali* in domestic cattle (*Bos Taurus*). *Applied Environmental Microbiology*, v. 45, p. 1394-1397, 1983.

EUROPEN A UNION. Regulation (EC) N° 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.

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.

GROBNER, M. A.; JOHNSON, D. E.; GROOBAL, S. R.; BENZ, D. A. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. **Journal Animal Science**, v. 55, p.491-497, 1982.

GUERRA, M. J. M.; BADELL, J. B.; ABAJES, A. R. R.; PÉREZ, H. B.; VALENCIA, R. M.; AZCUY, A. L. Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluídos al 30 e 80% de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf (caña santa). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 5, n. 1, p. 97-101, 2000.

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.

KHAN, M. M. H.;CHAULDHRY, 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.

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.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N.K. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 63, n. 6, p. 712-716, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, v. 1, 2002. 384 p.

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**, v. 154, 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.

MEHREZ, A. Z.; ØRSCOV, E. R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 437-443, 1977.

MAY, A.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B.; MORAES, A. R. A.; PINHEIRO, M. Q.; MARIO, M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 379-382, 2008.

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

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. Faltalocal: Editora, 1997. p 523-632.

NAIK, M. I.; FOMDA, B. A.; JAYKUMAR, E.; BHAT, J. A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Amsterdam, v. 3, n. 7, p. 535-538, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC). **Predicting feed intake of food-producing animals**. 7. rev. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1987. 85 p.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites inhibit methanogenesis in the rumen. **Journal of Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.

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

RUSSEL, J. B.; STROBEL, H. J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, n. 2, p. 552-558, 1988.

RYAN, J. P.; QUINN, T.; LEEK, B. L. Comparison of effects of *Yucca schidigera* plant extract (De-Odorize) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture, on pH, short chain fatty acids (SCFA) and ammonium, during fermentation of hay by sheep's ruminal fluid in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3222-3230, 1997.

SANTOS, F. A. P.; MENDONÇA, A. P. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, **Nutrição de Ruminantes**, v. 2, p. 265-297, 2011.

SANTOS, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Effects of addition of an essential oil complex to the diet lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 64-71, 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute. **Sas system for windows.** version 9. Cary: SAS, 2002.

TEDESCHI, L. O. Accounting for the effects of ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net Carbohydrate and Protein System. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1648, 2000.

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.

VAN DER MERWE, B. J.; DUGMORE, T. J.; WALSH, K. P. The effect of flavophospholipol (Flavomycin) on milk production and milk urea nitrogen concentration of grazing dairy cows. **South Africa Journal of Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 101-105, 2001.

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

WANG, Y.; ALEXANDER, T. W.; McALLISTER, T. A. *In vitro* effects of monensin and Tween 80 on ruminal fermentation of barley grain: barley silage-based diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 3/4, p. 197-209, 2004.

WU, Z.; SADIK, M.; SLEIMAN, F. T.; SIMAS, J. M.; PESSARAKLI, M.; HUBER, J. T. Influence of yuca extract on ruminal metabolism in cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1038-1042, 1994.

YANG, W. Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B. N.; CHAVES, A. V.; HE, M. L.; McALLISTER, T. A. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 12, p. 5671-5681, 2007.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES JR, A. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 828-833, 2009.

7 EXPERIMENTO III: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ALTO CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DO FRUTO DA AROEIRA (*Schinus Terebinthifolius*)

RESUMO

Os objetivos deste experimento foram avaliar o efeito da inclusão do óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*) sobre os parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio. Os tratamentos experimentais foram os seguintes: Controle negativo, dieta base (sem óleo essencial); Controle positivo, dieta base com adição de 25 ppm de monensina sódica/Kg de material natural, como oferecido; Dieta base com adição de 1,09 mL de óleo essencial/kg de MS; Dieta base com adição de 2,18 mL de óleo essencial/kg de MS; Dieta base com adição de 3,27 mL de óleo essencial/kg de MS. Trinta borregos castrados, mestiços Santa Ines x Dorper, canulados no rúmen com $53,23 \pm 12,05$ foram distribuídos em delineamento experimental tipo blocos completos casualizados com seis repetições por tratamento. Não observou-se efeito de tratamento ($P > 0,05$) para concentrações individuais de AGCC, AGCC totais e relação $C_2:C_3$. Não houve efeito de dia para concentrações de C_2 , C_3 , C_5 e, relação $C_2:C_3$. Houve tendência para efeito de dia para isobutirato ($P = 0,08$) e AGCC total ($P = 0,06$). Observou-se efeito de dia na concentração de isovalerato ($P = 0,04$). Não houve interação tratamento vs dia. Não observou-se efeito de tratamento, dia e interação tratamento vs dia para concentração de amônia no rumen. Observou-se efeito de dia ($P < 0,01$) sobre o pH ruminal, com ausência de efeito para tratamento e interação tratamento vs dia. Esse efeito de dia pode ser observado pela redução do pH ruminal ao longo dos dias para todos os tratamentos. Não houve efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo e digestibilidade dos nutrientes. Não observou-se efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao balanço de nitrogênio.

Palavras-chave: Óleo essencial. Fermentação ruminal. Digestibilidade. Balanço de nitrogênio. Ovinos, óleo de aroeira fruto.

ABSTRACT

The objectives of this experiment were to evaluate the effects of levels of inclusion of essential oils of Aroeira fruits (*Schinus Terebinthifolius*) on ruminal fermentation, nutrient digestibilities and nitrogen balancing. Thirty Lambs with 53.23 ± 12.05 kg of body weight, crossbreed Santa Ines x Dorper, cannulated in the rumen were distributed in experimental randomized complete block design with six replications per treatment. The treatments were: negative control, basal diet (no additive inclusion), positive control, basal diet with addition 25 ppm of sodium monensin, as fed; basal diet with 1.09; 2.18 and 3.27 mL of essential oil/kg of dry matter. There was no treatment effect for concentrations of individual SCFA, total SCFA and C₂: C₃ ratio. There was no day effect ($P > 0.05$) for concentrations of C₂, C₃, C₅ or C₂:C₃ ratio. There was a trend for day isobutyrate effect ($P = 0.08$), and total SCFA ($P = 0.06$). It was observed day effect on concentration of isovalerate ($P = 0.04$). There was no interaction between treatment vs day ($P > 0.05$). There was no effect of treatment, day and interaction vs day for concentration of ruminal ammonia. It was observed effect of day ($P < 0.01$) for ruminal pH, with no effect for treatment and treatment vs day interaction. The day effect that was observed can be seen by the reduction in ruminal pH throughout the day for all treatments. There was no effect for any of the intake evaluated and for nutrient digestibilities. No observed effect for any of the nitrogen balance.

Key words: Essential oils. Rumen fermentation. Digestibility. Nitrogen balance. Sheep, aroeira fruits.

7.1 INTRODUÇÃO

Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004). Óleos essenciais foram efetivos em manipular a fermentação ruminal *in vitro* (CASTILEJOS et al., 2006)

A *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é espécie arbórea que ocorre do Nordeste ao Sul do Brasil, apresentando folhagem densa e verde-escura com

frutos vermelhos em cachos (LORENZI, 2002); seus nomes populares mais comuns são aroeira-vermelha e aroeira-pimenta.

Seus frutos, folhas e tronco possuem óleos essenciais. As principais substâncias são: α -pineno, sabineno, β -pineno, α -felandreno, Δ -3-careno, β -felandreno, terpinen-4-ol, α -copaeno, germacreno-D, biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e α -cadinol (SANTOS et al., 2007).

Vários trabalhos comprovaram atividade antimicrobiana da aroeira, no extrato aquoso (LIMA et al., 2004), extrato etanólico a 30% (MARTÍNEZ et al., 1996), extrato hidroalcoólico e óleos essenciais (SILVA et al., 2010).

Silva et al. (2010) relataram que óleos essenciais da planta podem realizar atividade antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus albuns*. Estudos fitoquímicos antigos revelaram a presença de triterpenos álcoois, cetonas, ácidos, monoterpenos e sesquiterpenos na casca, folhas e frutos.

Araújo (2010), em estudo in vitro com óleo essencial de aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*), verificou aumento nas concentrações de propionato semelhantes à monensina e 12,0% maior que o tratamento controle (sem monensina e óleo), mostrando a capacidade desse óleo em manipular os parâmetros de fermentação ruminal, otimizando atividade de bactérias Gram negativas do rúmen e reduzindo a produção de metano em relação ao tratamento controle. Assim sendo, O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da adição do óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*) sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total de borregos, sobre o balanço de nitrogênio e a fermentação ruminal.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas instalações 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, localizada em Piracicaba – SP (22° 42' 24" S e 47° 37' 53" O), Brasil.

7.2.1 Animais e Instalações

Animais providos com cânulas ruminais foram alojados individualmente em baias no período dos dias zero ao dia 18 e, em seguida, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas para ensaios de metabolismo com dimensões de 1,30 x 0,55 m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina (Figura 4).

Figura 4 – Animais com arreiros para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas

Fonte: Arquivo pessoal

7.2.2 Delineamento Experimental

Trinta borregos castrados F1 (mestiços Dorper x Santa Inês) canulados no rúmen com peso médio de $45,6 \pm 10,4$ kg e sete meses de idade foram utilizados no experimento. O período experimental teve duração de 23 dias, sendo 18 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais, quatro dias para a determinação do CMS, colheita de fezes e urina, e um dia (23º) para colheita de conteúdo ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental em blocos completos casualizados (6 blocos e 5 tratamentos). Em todos os tratamentos os animais foram alimentados com uma dieta base (90% concentrado e 10% de volumoso) os tratamentos experimentais foram os seguintes: 1) Controle (sem óleo

essencial e sem monensina sódica); 2) dieta base adicionada com 1,09 mL de óleo do fruto da aroeira/ kg de matéria seca ou 1,25 mL/kg de matéria natural; 3) dieta base adicionada com 2,18 mL de óleo do fruto da aroeira/kg de matéria seca ou 2,50 mL/kg de matéria natural; 4) dieta base adicionada com 3,27 mL de óleo do fruto da aroeira/ kg de matéria seca ou 3,75 mL/ kg de MS e, 5) Monensina sódica (25 mg/kg de MS).

7.2.3 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 1 cm. Em seguida foram misturados ao farelo de soja, milho moído calcário, mistura mineral e, no caso do controle positivo, à monensina sódica (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 foram adicionados na dieta total no momento da oferta. O Rumensin 200 foi misturado na ração (12,5 g/100 kg, com o auxílio do misturador mencionado acima.

Todos os dias do período experimental, as rações foram pesadas em balança eletrônica de precisão e ofertadas *ad libitum* 2 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.

7.2.4 Colheita e análises de amostras de conteúdo ruminal

Nos dias 0 (dia anterior ao início do fornecimento das dietas experimentais), 7, 14 e 21 foi colhido conteúdo ruminal. As colheitas foram realizadas zero horas (antes do fornecimento da ração), 3, 6 e 9 horas após o fornecimento das rações do período da manhã. Logo após a colheita, as amostras foram filtradas em tecido de nylon, sendo em seguida realizada a medição imediata do pH em potenciômetro digital (DIGIMED® DM20). Do fluido filtrado, foram retiradas duas alíquotas de 25 mL e foram

imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C para posterior determinação da concentração de AGCC e N amoniacal.

7.2.5 Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes

Depois de descongeladas, as amostras das rações ofertadas, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Em seguida todas as amostras 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 orgânica (MO) foi obtida por meio da incineração da amostra em forno 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). O teor de extrato etéreo foi determinado utilizando um aparelho Leco TFE2000 (LECO® Corp.). A concentração de FDN foi determinada conforme Van Soest (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom A 2000 (Ankom Tech. Corp., Macedon, NY). O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado pelo método Microkjeldahl (AOAC, 1997).

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total foi calculada subtraindo-se da quantidade consumida de cada nutriente pela excreção fecal do respectivo nutriente. O N retido foi calculado pela diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina, o N retido foi expresso em % do N consumido e em % do N digerido.

As proporções dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais encontram-se na (Tabela 10) em que, o tratamento CTL foi acrescido de monensina sódica ou respectivas doses do óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*).

Tabela 10 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % da MS

Item	Tratamentos ¹				
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27
Ingredientes					
Feno de “coastcross”	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de soja	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
Milho moído	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0
Cloreto amônio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcáreo	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
Mistura mineral ²	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Óleo essencial (mL/ 100 kg MS)	0	0	109,0	218,0	327,0
Monensina (ppm)	0	25,0	0	0	0
Composição química					
MS (% da MO)	89,0	89,0	89,0	89,0	89,0
Matéria orgânica	92,5	92,5	92,5	92,5	92,5
Proteína bruta	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Extrato etéreo	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9
FDN ³	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina 25 mg/kg de matéria natural, como oferecido; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 2,18= dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 3,27= dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*).

²composição: Ca 13,4%, P 7,5%, Mg 1%, S 7%, Cl 21,8%, Na 14,5%, Mn 1100 mg/kg, Fe 500 mg/kg, Zn 4600 mg/kg, Cu 300 mg/kg, Co 40 mg/kg, I 55 mg/kg, Se 30 mg/kg.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro

7.2.6 Composição do óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*)

A composição do óleo essencial de Aroeira fruto (*Schinus terebinthifolius*) foi determinada no laboratório de Química e análise de alimentos da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz da Universidade de São Paulo em cromatógrafo equipado com coluna RTX 5MS com 30 m de comprimento e 0,25 mm de espessura com temperatura inicial de 40 °C por 8 minutos (rampa 1) aumentando 3 °C por minuto até 180 °C (rampa 2) e 20 °C até 230 °C (rampa 3) por um período total de 77,17 minutos (Tabela 11).

Tabela 11 - Composição do óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*)

Composto	Aroeira frutos
	% relative
α Pineno	21,42
P-cimeno	16,15
β L pineno	1,55
Micreno	3,61
α Felandreno	15,07
Δ 3 careno	17,42
α Terpineno	0,42
Silvestreno	18,15
α Terpinoleno	1,20
α Felandreno epoxide	0,99
Carofileno	1,62
D germacreno	0,58
Δ Cadineno	0,37
Não identificados	1,45

7.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Após o período de adaptação, nos dias 19, 20, 21 e 22, às 7:00 horas da manhã, a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foi mensurado. As fezes foram pesadas em balança de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, foram colhidas amostras (10%) da produção fecal e de urina diária. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos coletores das gaiolas em vasilhames contendo ácido clorídrico 6N, 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 medido o consumo de ração e com base no consumo diário de ração foi realizada a oferta do dia posterior, de modo que as sobras não fossem superiores a 10%, sendo colhida amostras das mesmas no último dia para análises bromatológica, visando determinar a digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Todos os animais foram pesados no primeiro e no último dia de cada período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

7.2.8 AGCC e N-amoniaco

Para determinação dos AGCC; 1,2 mL de fluido ruminal adicionado com 0,3 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) foram centrifugados (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) por 30 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 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-NH₃ foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (BIO – RAD, Hercules, CA), utilizando-se filtro para absorvância de 550 nm.

7.2.9 Análise estatística

Os dados de características de fermentação ruminal do experimento foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (2002). As médias de cada tratamento foram obtidas utilizando o comando LSMEANS, em que o efeito de dia foi significativo quando analisado através da comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. A interação tratamento vs dia também foi avaliada na análise de variância e, quando significativa, foi desdobrada através de comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. Foi estabelecido nível aceito para tendência entre 5 e 10%. Os efeitos de semana e interação dieta x semana foram definidos pelo teste F da análise de variância.

Os dados de consumo, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados utilizando o procedimento “MIXED” do SAS (2002). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. Os efeitos foram declarados significativos quando $P < 0,05$. O modelo estatístico utilizado para análise dos dados de consumo e digestibilidade dos nutrientes, foi o que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + E_{ij}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco acaso ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5) e E_{ij} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

Os dados de características fermentação ruminal, foram analisados conforme o modelo que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + S_{ij} + T_k + (DT)_{jk} + E_{ijk}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5), S_{ij} = erro residual associado ao efeito do animal (blocos x dieta), T_k = efeito de dia ($k = 1$ a 5), $(DT)_{jk}$ = interação entre dieta x dia e E_{ijk} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Parâmetros ruminais

Não observou-se efeito de tratamento para concentrações individuais de AGCC, AGCC totais e relação acetato:propionato (Tabela 12). Adicionalmente, não houve efeito de dia para concentrações de acetato, propionato, valerato e relação acetato/propionato. No entanto, houve tendência para efeito de dia para isobutirato ($P = 0,08$) e AGCC total ($P = 0,06$). Observou-se efeito de dia na concentração de isovalerato ($P = 0,04$). Não foi observado interação tratamento vs dia para nenhum dos AGCC. Esta ausência de efeito pode ter sido devido as dosagens utilizadas no presente estudo, visto que os efeitos dos óleos essenciais nos parâmetros ruminais são dose dependente (CARDOZO et al., 2004). Estes dados não estão de acordo com Araújo (2010), que observaram aumentos significativos na concentração de C_3 e redução na produção de CH_4 ao trabalhar em sistema *in vitro* com este óleo essencial. Considerando que um dos principais vantagens em utilizar óleos essenciais na alimentação de ruminantes seria o fato de alguns deles manipular alguns parâmetros, como, diminuir a relação $C_2:C_3$, aumentando C_3 e reduzindo C_2 ou, somente reduzindo C_2 , isto não pode ser observado no presente estudo. Podemos afirmar que as doses

utilizadas do óleo essencial não foram suficientes para atuar sobre a população microbiana no rúmen (PATRA; SAXENA, 2010). Também em estudo realizado *in vitro*, a adição de 20 µg/mL de alicina não teve efeitos sobre a concentração de AGCC totais e concentração de NH₃ (McALLISTER; NEWBOLD, 2008).

Targer e Krause (2011) ao testarem óleo essencial de cinamaldeído, eugenol e capsicum, não encontraram efeito nas concentrações individuais e AGCC totais. Estes resultados estão de acordo com o presente estudo, confirmando que efeitos de alguns óleos essenciais são dose dependente. Também Kiaosa-ard e Zebeli (2013) observaram, em extensa revisão, que para alguns óleos essenciais, os efeitos são dose dependente.

Tabela 12 - Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com as dietas experimentais (Continua)

Item	Dia	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de p	
		CTL	MON	1,09	2,18		3,27	Trat.
AGCC, mM/100 mM								
Acetato, %	7	49,90	50,20	53,22	54,40	55,50		
	14	54,49	50,50	50,56	53,77	55,12		
	21	53,29	56,38	55,47	52,29	53,38	0,91	0,40
Média		52,56	52,46	53,08	53,48	54,66		
Propionato, %	7	34,84	34,89	30,18	26,85	28,27	1,51	
	14	32,61	38,51	36,15	29,51	29,04	1,60	
	21	31,10	31,51	28,15	32,42	30,83	1,34	
Média		32,85	34,97	31,49	29,59	29,38		
Isobutirato, %	7	0,85	0,95	0,98	0,89	0,86	0,05	
	14	0,71	0,77	0,83	0,73	0,87	0,05	
	21	0,73	0,80	0,82	0,76	0,71	0,76	0,08
Média		0,76	0,84	0,88	0,79	0,81		
Butirato, %	7	11,13	10,43	12,01	12,99	11,00	0,60	
	14	12,05	7,69	8,81	11,01	10,37	0,63	
	21	9,76	8,24	12,29	10,38	11,23	0,41	0,08
Média		10,98	8,78	11,03	11,46	10,86		
Isovalerato, %	7	1,85	2,01	2,71	2,31	2,17	0,17	
	14	1,63	1,74	2,17	1,74	2,04	0,16	
	21	1,80	1,51	2,62	1,68	1,63	0,40	0,74
Média		1,76	1,75	2,50	1,91	1,95		
Valerato, %	7	1,31	1,50	1,57	1,59	1,37	0,07	
	14	1,27	1,56	1,42	1,32	1,38	0,08	
	21	1,44	1,30	1,31	1,50	1,39	0,95	0,42
Média		1,34	1,45	1,43	1,47	1,38		

(Conclusão)									
Item	Dia	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de p	
		CTL	MON	1,25	2,50	3,75		Trat.	Trat.vs Dia
Acetato:propionato	7	1,55	1,55	1,98	2,11	2,07	0,11		
	14	1,69	1,41	1,46	1,98	2,12	0,12		
	21	1,95	1,95	2,08	1,63	1,95	0,13	0,71	0,47
Média		1,73	1,64	1,84	1,91	2,05			0,32
AGCC TOTAL, Mm/L							3,29		
	7	115,93	99,17	105,37	104,14	99,70	3,04		
	14	123,35	107,09	117,80	114,62	107,71	3,50	0,83	0,06
	21	104,36	118,94	108,29	106,47	106,72			0,38
Média		114,55	108,40	110,48	108,41	104,71			
N-NH ₃ , mg/dL							0,71		
	7	17,79	18,40	19,72	14,65	19,47	0,89		
	14	18,54	16,74	18,54	13,52	21,03	0,72	0,10	0,10
	21	17,53	18,53	20,77	18,39	21,03			0,32
Média		17,86	17,89	19,68	15,52	20,51			
pH							0,05		
	7	5,68	5,76	5,78	5,82	5,68	0,05		
	14	5,54	5,53	5,57	5,67	5,61	0,05	0,84	<0,01
	21	5,39	5,40	5,47	5,54	5,47	0,05		1,00
Média		5,53	5,56	5,61	5,68	5,59			

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*).

² EPM = erro padrão da média

Não observou-se efeito de tratamento, dia e interação tratamento vs dia para concentração de amônia no rúmen (Tabela 12). Esta ausência de efeito pode ser explicada pelo fato das doses utilizadas não terem sido suficientes para atuar sobre a população microbiana deste órgão (McALLISTER; NEWBOLD, 2008). Da mesma forma, Fraser et al. (2007), não observaram efeito na concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen quando trabalhavam com cinamaldeído na dosagem de 500 mg/L de conteúdo ruminal.

Por outro lado, em estudo realizado *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 NH₃ (McALLISTER; NEWBOLD, 2008).

Novilhas recebendo óleo essencial de anis em dietas com 90% de concentrado, observou-se redução na concentração de amônia ruminal (CARDOZO et al., 2006; FADIÑO et al., 2008). Estes autores observaram efeito contrário ao do presente estudo, concluindo que alguns óleos essenciais possuem capacidade de atuar sobre bactérias hiper produtoras de amônia. Em estudo *in vivo*, Wu et al. (1994) trabalhando com dose de 400 mg de Yuca/kg de matéria seca, não observaram efeito na concentração de amônia ruminal.

Não houve efeito de tratamento sobre o pH ruminal (Tabela 12). Observou-se efeito de dia ($P < 0,01$), com ausência de efeito para tratamento e interação tratamento vs dia. Esse efeito de dia foi devido à redução do pH ruminal ao longo dos dias para todos os tratamentos, o que pode ser um indício de aumento da atividade da amilase no rúmen, tornando-o mais ácido ao longo do tempo, devido ao aumento na população de amilolíticas (VALADARES FILHO; PINA 2011). 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 apetite são também diminuídos (MOULD et al., 1983; BRITTON; STOCK, 1987).

Os dados do presente estudo estão de acordo com Targer e Krause (2011) que trabalharam com três óleos essenciais (cinamaldeído, eugenol e capsicum), não encontrando efeito para pH ruminal (média 5,72).

De acordo com os dados do presente estudo, Tekippe et al. (2011), ao utilizarem vacas em lactação e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) na dose de 500 g/dia, também não observaram efeito no pH ruminal.

A ausência de efeito no pH ruminal no presente estudo pode explicar a ausência de efeito nas concentrações de AGCC, devido ao fato de que o pH é altamente correlacionado com a concentração dos mesmos, os quais são os principais produtos finais da fermentação e os mais importantes no metabolismo energético em ruminantes (RUSSEL; DOMBROUSKI, 1980).

Vários autores não verificaram efeito do fornecimento de óleo sobre o pH ruminal, o que mostra que vários óleos essenciais exercem pouco ou nenhum efeito sobre esta variável (NEWBOLD et al., 2004; FRASER et al., 2007; WANG et al., 2009; YANG et al., 2010a,b; ANASSORI et al., 2011; GIANNENAS et al., 2011; KHOLIF et al., 2012; MANH et al., 2012; HRISTOV et al., 2013).

7.3.2 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

Não houve efeito dos tratamentos sobre nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo e digestibilidade dos nutrientes (Tabela 13). Esta ausência de efeito indica que a quantidade de óleo essencial fornecidas, pode não ter sido o suficiente para manipular nenhuma das variáveis relacionadas à fermentação ruminal no presente estudo.

Esta ausência de efeito pode também ser explicada pelo modo de como o óleo foi fornecido aos animais e suas respectivas doses (misturado na ração no momento da oferta) pois ainda não é conhecido se pode ocorrer interferência do ambiente (calor, umidade) em termos de oxidação e/ou volatilização de seus componentes, ou até mesmo alguma reação quando em contato com a ração.

Tabela 13 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes em borregos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de p
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
Consumo, Kg/dia							
MS	1,20	1,20	1,16	1,17	1,25	0,04	0,95
MSPC (%)	2,23	2,23	2,18	2,39	2,34	0,06	0,62
MSPC ^{0,75} (g/kg)	60,90	60,90	58,90	59,30	63,45	0,15	0,31
FDN	0,17	0,17	0,16	0,16	0,18	0,01	0,79
FDNPC	0,31	0,31	0,29	0,33	0,32	0,01	0,46
MO	1,11	1,11	1,07	1,08	1,15	0,04	0,96
PB	0,18	0,18	0,17	0,17	0,19	0,01	0,92
EE	0,035	0,033	0,034	0,035	0,037	<0,01	0,92
Digestibilidade, %							
MS	83,00	84,04	80,47	82,14	83,43	0,62	0,55
FDN	77,90	78,06	72,47	77,39	75,50	1,10	0,47
MO	85,12	86,02	83,40	83,73	85,24	0,63	0,74
PB	79,15	79,76	76,00	76,58	79,09	0,89	0,70
EE	77,47	76,99	71,04	71,93	73,24	1,66	0,14

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*).

² EPM = erro padrão da média

MS = matéria seca; MSPC = matéria seca em % do peso corporal; MSPC^{0,75} = matéria seca em % do peso metabólico; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDNPC = fibra insolúvel em detergente neutro em % do peso corporal; MO = Matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo.

Um dos principais efeitos dos óleos essenciais no rúmen é a redução na degradação da proteína acompanhado da inibição da degradação de aminoácidos (CALSAMIGLIA et al., 2007). Este fato não pode ser observado no presente estudo, uma vez que não houve efeito na digestibilidade dos nutrientes nem da proteína bruta.

Ao avaliar doses de óleos essenciais nos compostos de cinamaldeído, eugenol e pimenta para vacas em lactação, Targer e Krause (2011) também não encontraram nenhuma resposta na digestibilidade média da FDN, FDA, MS, MO, PB e amido.

A ausência de efeito no consumo e digestibilidades dos nutrientes do presente estudo está de acordo com vários autores (BENCHAAAR et al., 2008a; MALECKY et al., 2009; MEYER et al., 2009; SANTOS et al., 2010; TARGER; KRAUSE, 2011).

7.3.3 Balanço de nitrogênio

Não observou-se efeito dos tratamentos para nenhuma das variáveis relacionadas ao balanço de nitrogênio (Tabela 14).

Tabela 14 - Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados como as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
N ingerido, g/dia	28,83	28,67	27,00	28,00	30,00	0,91	0,90
N fezes, g/dia	6,17	5,67	6,79	6,67	6,17	0,36	0,92
N urina, g/dia	19,23	13,22	14,82	14,33	18,87	1,07	0,39
N retido, g/dia	8,85	7,95	8,16	7,38	7,90	0,79	0,99
DAP ³ , %	79,15	79,76	76,00	76,57	79,09	0,89	0,67

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira frutos (*Schinus terebinthifolius*).

² EPM = erro padrão da média

² EPM = erro padrão da média;

³ DAP = digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio;

Esta ausência de efeito no balanço de Nitrogênio pode ser explicada pela ausência de efeito no consumo e digestibilidade dos nutrientes, uma vez que os animais estavam em fase de crescimento mantendo o balanço de nitrogênio positivo.

As ausências de efeito nos parâmetros relacionados ao balanço de nitrogênio podem ser explicadas devido à ausência de efeito no consumo de N (g/dia) em que o aumento no consumo de nitrogênio está largamente associado à saída de ureia do fígado para urina e, um aumento na concentração de ureia no sangue, é associado com grande taxa de excreção de nitrogênio na urina (VAN SOEST, 1994).

7.4 CONCLUSÃO

Não houve efeito nas concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, consumo e digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio. Mais estudos necessitam ser realizados sobre a forma de oferta desse óleo e outros assim como avaliar outras dosagens em relação as utilizadas no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.

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

BENCHAAAR, C.; McALLISTER, T. A.; CHOUINARD, P. Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, 4765-4777, 2008.

BRITTON, R. A.; STOCK, R. A. Acidosis, rate of starch digestion and intake. **Oklahoma Agriculture Experimental**. Stn. MP-121, p. 125-137, 1987.

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.

CHAVES, A. V.; STANFORD, K.; DUGAN, M. E. R.; GIBSON, L. L.; McALLISTER, T. A.; VAN HERK, F.; BENCHAAAR, C. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites growth performance and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 17, p. 215-224, 2008.

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

DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; McLAREN, J. B. Occurrence of rumen ciliate *Oligosotrich bubali* in domestic cattle (*Bos Taurus*). *Applied Environmental Microbiology*, v. 45, p. 1394-1397, 1983.

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.

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.

KHIAOSA-ARD, R.; ZEBELI, Q. Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 1819-1830, 2013.

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.

- LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; LIMA, I. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, E. L. *Schinus terebenthifolius* Raddi: avaliação do espectro de ação antimicrobiana de seu extrato aquoso. **Infarma**, Brasília, v. 16, n. 7/8, p. 83-85, 2004.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1, 384 p.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- 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**, v. 154, p. 24-35, 2009.
- McALLISTER, T. A.; NEWBOLD, C. J. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, East Melbourne, v. 48, n. 1/2, p. 7-13, 2008.
- 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.
- MARTÍNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebenthifolius* Raddi (Copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 1, n. 3, p. 37-39, 1996.
- MEHREZ, A. Z.; ØRSCOV, E. R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 437-443, 1977.
- 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.
- 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.
- PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites inhibit methanogenesis in the rumen. **Journal of Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.
- RUSSEL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v. 39, p. 604, 1980.

- SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTTINI, F.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1011-1013, 2007.
- SANTOS, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 157, n. 1/2, p. 64-71, 2010.
- SILVA, A. B.; SILVA, T.; FRANCO, E. S.; RABELO, S. A.; LIMA, E. R.; MOTA, R. A.; da CAMARA, C. A. G.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA FILHO, J. V. Antibacterial Activity, Chemical Composition, And Citotoxicity of Leafs Essential Oil form Brazilian Peper Tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi). **Bazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 158-163, 2010.
- 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.
- VAN DER MERWE, B. J.; DUGMORE, T. J.; WALSH, K. P. The effect of flavophospholipol (Flavomycin) on milk production and milk urea nitrogen concentration of grazing dairy cows. **South Africa Journal of Animal Science**, v.31, n. 2, p. 101-105, 2001.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Comstock: Cornell University Press, 1994. 476 p.
- WU, Z.; SADIK, M.; SLEIMAN, F. T.; SIMAS, J. M.; PESSARAKLI, M.; HUBER, J. T. Influence of yuca extract on ruminal metabolism in cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1038-1042, 1994.
- YANG, W. Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B. N.; BEUCHEMIN, K. A. Dose response to cynamaldehyde supplementation in growing beef heifers: Ruminal and intestinal digestion. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, p. 680-688, 2010b.
- YANG, W. Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B. N.; BEUCHEMIN, K. A. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, p. 57-64, 2010a.

8 EXPERIMENTO IV: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM LATO TEOR DE CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DE CAPIM LIMÃO (*Cymbopogon flexuosus*)

RESUMO

Os objetivos deste experimento foram avaliar o efeito da inclusão de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*), sobre os parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio. Os tratamentos experimentais foram os seguintes: controle negativo (sem óleo essencial), controle positivo (com adição de 25 ppm de monensina), 1,25 (1,25 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta), 2,50 (2,50 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta), 3,75 (3,75 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta). Trinta borregos castrados mestiços da raça Santa Inês x Dorper, canulados no rumen com $59,66 \pm 10,13$ kg de peso corporal foram distribuídos em delineamento experimental tipo blocos completos casualizados com seis repetições por tratamento. Não houve efeito de tratamento para nenhuma das variáveis ruminais. Observou-se efeito de dia ($P < 0,05$) para propionato, butirato, isovalerato, relação $C_2:C_3$, nitrogênio amoniacal no rumen e pH. Também observou-se tendência ($P = 0,09$) para efeito de dia, reduzindo a concentração de isobutirato, acompanhado de interação tratamento vs dia ($P < 0,01$). Houve efeito de dia ($P < 0,05$) para concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen. Não houve efeito de tratamento nem interação tratamento vs dia para esta variável. Observou-se que em todos os tratamentos, houve aumento nas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen com o passar dos dias. Houve efeito de dia para pH ruminal ($P = 0,04$), porém não houve efeito de tratamento nem interação tratamento vs dia. Não houve efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo e digestibilidade dos nutrientes. Observou-se redução no CMS kg/dia da ordem de 4,0% e 9,0% para MON e doses de óleo essencial de capim limão, respectivamente. Não houve efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao balanço de nitrogênio.

Palavras-chave: Óleo essencial. Fermentação ruminal. Digestibilidade Balanço de nitrogênio. Ovinos. Capim limão

ABSTRACT

This experiment was conducted for evaluate effects on levels of inclusion fo Lemongrass essential oil (*Cymbopogon citratus*) in rumen fermentation parameters, nutrients digestibility and nitrogen balancing. The treatments were: negative control (no additive inclusion), positive control (with addition 25 ppm of monensin), (1,25 ; 2,50 and 3,75 mL of essential oil/ kg as feed). Thirty Lambs castrated with $59,66 \pm 10,13$ kg of body weight, crossbreed Santa Ines x Dorper, canulated in the rumen were distributed in experimental randomized complete block design with six replications per treatment. There was no treatment effect for any of the ruminal variables. It was observed effect of day ($P < 0.05$) for C_3 , butyrate, isovalerate, $C_2:C_3$ ratio, ammonia in the rumen pH. Also there was a trend ($P = 0.09$) effect of day for reducing the concentration isobutyrate, followed by treatment vs day interaction ($P < 0.01$). There was day effect ($P < 0.05$) for ammonia nitrogen concentration in the rumen. Treatments had no effect treatment vs no interaction day on this variable. It is observed that in all treatments, there was an increase in nitrogen ammonia in the rumen with each passing day. It was observed daily effect for ruminal pH ($P = 0.04$), but no treatment effect or interaction treatment vs day. There was no effect for the variables related to intake and digestibility of nutrients. However there was reduction in DMI (kg/day) of order of 4.0% and 9.0% for MON and Lemongrass essential oil of lemon doses respectively. There was no effect for any of the variables related to the nitrogen balance.

Key words: Essential oils. Rumen manipulation as fermentation. Digestibility. Nitrogen balance. Sheep. Lemongrass

8.1 INTRODUÇÃO

Há séculos, compostos extraídos dos vegetais são utilizados pelas mais diversas civilizações humanas com fins medicinais, industriais e, inclusive, com aplicações na fabricação de alimentos. Muitos extratos vegetais possuem atividade antimicrobiana comprovada (CALSAMIGLIA et al., 2007) e, simultaneamente, grande parte deles possui status GRAS (“generally recognized as safe”) para consumo humano (FDA,

2004), o que lhes confere alternativa natural e segura aos antibióticos. A atividade antimicrobiana deste óleo essencial é citada na literatura em que vários autores sugerem que o citral é o principal responsável por essa atividade (MENENDÉ, 1993; MAHMOUD, 1994).

Araújo (2010) verificou capacidade deste óleo essencial reduzir a produção de CH₄ em sistema *in vitro* de produção de gás para a dosagem mais alta utilizada, causando apenas redução na concentração de C₂ e C₃, comprovando que em altas doses, este óleo essencial pode inibir tanto produtoras de C₂ como as de C₃. Já para a dose mais baixa utilizada, este mesmo autor observou aumento nas concentrações de C₂ e C₃, conseqüentemente, na produção de CH₄.

O Capim limão (*Cymbopogum flexuosus*) é uma planta do mesmo gênero do capim cidreira, porém, mais rara no Brasil. Recebe o nome internacional de capim limão da Índia Oriental (Eats Indian Lemongrass). Muitas vezes, ambas as plantas recebem a mesma denominação (MAY et al., 2008). A mistura de geranial e neral faz seu óleo essencial rico em citral, com concentração próxima a 60% do total do óleo.

Efeitos antifúngicos e antibacterianos moderados já foram encontrados no óleo de capim limão, sendo atribuídos ao citral (KUMAR et al., 2009).

O óleo essencial de capim limão do sudeste asiático, apresenta propriedades antifúngica, antibacteriana, ação diurética, anticarcinogênico, mecanismos de proteção gástrica e proteção contra parasitos (ONAWUNMI, 1989; GALVEZ et al., 1998; CIMANGA et al., 2002; SANTORO et al., 2007; IRKIN; KORUKLUOGLU, 2009; FERNANDEZ et al., 2012; KHAN; AHMAD, 2012).

O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito da adição do Óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) sobre o consumo e digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total, balanço de nitrogênio e fermentação ruminal em ovinos.

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas instalações 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, localizada em Piracicaba – SP (22° 42' 24" S e 47° 37' 53" O), Brasil.

8.2.1 Animais e Instalações

Animais providos com cânulas ruminais foram alojados individualmente em baias no período dos dias zero ao dia 18 e, em seguida, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas para ensaios de metabolismo com dimensões de 1,30 x 0,55 m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina (Figura 5).

Figura 5 - Animais com arreio para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas

Fonte: Arquivo pessoal

8.2.2 Delineamento Experimental

Trinta borregos, castrados, F1 (Dorper x Santa Inês) canulados no rúmen com peso médio de $53,23 \pm 12,04$ kg e sete meses de idade foram utilizados no experimento. O período experimental teve duração de 23 dias, sendo 18 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais, quatro dias para a

determinação do CMS, colheita de fezes e urina, e um dia (23^o) para colheita de conteúdo ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental em blocos completos casualizados (6 blocos e 5 tratamentos). Em todos os tratamentos os animais foram alimentados com uma dieta base (90% concentrado e 10% de volumoso) os tratamentos experimentais foram os que segue: 1) Controle (sem óleo essencial e sem monensina sódica); 2) dieta base adicionada com 1,09 mL de óleo do fruto da aroeira/kg de matéria seca ou 1,25 mL/kg de matéria natural; 3) dieta base adicionada com 2,18 mL de óleo do fruto da aroeira/kg de matéria seca ou 2,50 mL/kg de matéria natural; 4) dieta base adicionada com 3,27 mL de óleo do fruto da aroeira/kg de matéria seca ou 3,75 mL/kg de matéria natural e, 5) Rumensin 200 (Monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural).

8.2.3 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 1 cm. Em seguida, foram misturados ao farelo de soja, milho moído calcário, mistura mineral, formando a dieta basal para todos os tratamentos. O tratamento, controle positivo, à monensina sódica, (12,5 g de Rumensin 200[®]/100 kg da dieta base, Elanco do Brasil, São Paulo, Brasil) foi misturada utilizando-se o mesmo misturador que foi utilizado para misturar a dieta base, sem aditivo (Misturador horizontal capacidade 500 Kg, Lucato[®], Limeira, Brasil). Por se tratar de quantidade pequena, e para maior controle da quantidade fornecida, os óleos essenciais foram adicionados na dieta base no momento da oferta.

Todos os dias do período experimental, as rações foram pesadas em balança eletrônica de precisão e ofertadas *ad libitum* 2 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.

8.2.4 Coletas e análises de amostras de conteúdo ruminal

Nos dias 0 (dia anterior ao início do fornecimento das dietas experimentais), 7, 14 e 21 foi colhido conteúdo ruminal. As colheitas foram realizadas zero horas (antes do fornecimento da ração), 3, 6 e 9 horas após o fornecimento das rações do período da manhã. Logo após a colheita, as amostras foram filtradas em tecido de nylon, sendo em seguida realizada a medição imediata do pH em potenciômetro digital (DIGIMED® DM20). Do fluido filtrado, foram retiradas duas alíquotas de 25 mL e foram imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C para posterior determinação da concentração de AGCC e N amoniacal.

8.2.5 Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes

Depois de descongeladas, as amostras das rações ofertadas, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Em seguida todas as amostras 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 orgânica (MO) foi obtida por meio da incineração da amostra em forno 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). O teor de extrato etéreo foi determinado utilizando um aparelho Leco TFE2000 (LECO® Corp.). A concentração de FDN foi determinada conforme Van Soest (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em um aparelho Ankom A 2000 (Ankom Tech. Corp., Macedon, NY). O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado pelo método Microkjeldahl (AOAC, 1997).

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total foi calculada subtraindo-se da quantidade consumida de cada nutriente pela excreção fecal do respectivo nutriente. O N retido foi calculado pela diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina, o N retido foi expresso em % do N consumido e em % do N digerido.

As proporções dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais encontram-se na (Tabela 15) em que, o tratamento CTL foi acrescido de monensina sódica ou respectivas doses do óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

Tabela 15 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % da MS

Item	Tratamentos ¹				
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27
Ingredientes, %					
Feno "coastcross"	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Farelo de soja	16,0	16,0	16,0	16,0	16,0
Milho moído	70,0	70,0	70,0	70,0	70,0
Cloreto amônio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcáreo	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
Mistura mineral ²	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Óleo Essenciais (mL/100 kg MS)	0	0	109,0	218,0	327,0
Monensina sódica (ppm)	0	25,0	0	0	0
Composição química, % da MS					
MS (% da MO)	87,5	87,5	87,5	87,5	87,5
Matéria orgânica	95,0	95,0	95,0	95,0	95,0
Proteína bruta	15,7	15,7	15,7	15,7	15,7
Extrato etéreo	2,83	2,83	2,83	2,83	2,83
FDN ³	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

²composição: Ca 13,4%, P 7,5%, Mg 1%, S 7%, Cl 21,8%, Na 14,5%, Mn 1100 mg/kg, Fe 500 mg/kg, Zn 4600 mg/kg, Cu 300 mg/kg, Co 40 mg/kg, I 55 mg/kg, Se 30 mg/kg.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total foi calculada subtraindo-se da quantidade consumida de cada nutriente pela excreção fecal do respectivo nutriente. O N retido foi calculado pela diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina, sendo o N retido expresso em % do N consumido e em % do N digerido.

8.2.6 Composição do óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*)

A composição do óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) foi determinada no laboratório de Química e análise de alimentos da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz da Universidade de São Paulo em cromatógrafo equipado com coluna RTX 5MS com 30 m de comprimento e 0,25 mm de espessura com temperatura inicial de 40 °C por 8 minutos (rampa 1) aumentando 3 °C por minuto até 180 °C (rampa 2) e 20 °C até 230 °C (rampa 3) por um período total de 77,17 minutos (Tabela 16).

Tabela 16 - Composição do óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*)

Composto	Capim Limão
	% relativa
α -Pineno	0,21
2,2- dimetil	1,61
6 metil	2,44
Micreno	1,70
α -Limoneno	0,37
Propil Cetona	0,87
α -naginateno	0,14
Citronelal	0,60
β Linalol	0,77
Oxido furan	0,34
Neral	37,07
Isogeranial	0,57
Neril acetate	0,82
2,6 octadieno dimetil	0,72
Oxido Cariofileno	1,13
2,6 octadienal dimetil	49,95
Cariofileno	1,50

8.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Após o período de adaptação, nos dias 19, 20, 21 e 22, às 7:00 horas da manhã, a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foi mensurado. As fezes foram pesadas em balança de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, foram colhidas amostras (10%) da produção fecal e de urina diária. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos coletores das gaiolas em vasilhames contendo ácido clorídrico 6N, 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 medido o consumo de ração e com base no consumo diário de ração foi realizada a oferta do dia posterior, de modo que as sobras não fossem superiores a 10%, sendo colhida amostras das mesmas no último dia para análises bromatológica, visando determinar a digestibilidade aparente total dos nutrientes. Todos os animais foram pesados no primeiro e no último dia de cada período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

8.2.8 AGCC e N-amoniaco

Para determinação dos AGCC 1,2 mL de fluido ruminal adicionado com 0,3 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) foram centrifugados (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) por 30 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 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-NH₃ foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (BIO – RAD, Hercules, CA), utilizando-se filtro para absorvância de 550 nm.

8.2.9 Análise estatística

Os dados de características de fermentação ruminal do experimento foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (2002). As médias de cada tratamento foram obtidas utilizando o comando LSMEANS, em que o efeito de dia foi significativo quando analisado através da comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. A interação tratamento vs dia também foi avaliada na análise de variância e, quando significativa, foi desdobrada através de comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. Foi estabelecido nível aceito para tendência entre 5 e 10%. Os efeitos de semana e interação dieta x semana foram definidos pelo teste F da análise de variância.

Os dados de consumo, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados utilizando o procedimento “MIXED” do SAS (2002). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. Os efeitos foram declarados significativos quando $P < 0,05$. O modelo estatístico utilizado para análise dos dados de consumo e digestibilidade dos nutrientes, foi o que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + E_{ij}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco acaso ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5) e E_{ij} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

Os dados de características fermentação ruminal, foram analisados conforme o modelo que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + S_{ij} + T_k + (DT)_{JK} + E_{ijk}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5), S_{ij} = erro residual associado ao efeito do animal (blocos x dieta), T_k = efeito de dia ($k = 1$ a 5), $(DT)_{JK}$ = interação entre dieta x dia e E_{ijk} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.3.1 Parâmetros ruminais

Não houve efeito de tratamento para nenhuma das variáveis ruminais (Tabela 17). Observou-se efeito de dia ($P < 0,05$) para C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , relação $C_2:C_3$, nitrogênio amoniacal no rúmen e pH. Também observou-se tendência ($P = 0,09$) para efeito de dia para isobutirato, reduzindo sua concentração ao longo dos dias, acompanhado de interação tratamento vs dia ($P < 0,01$) para esta variável (Tabela 17)

(Continua)

Tabela 17 - Parâmetros ruminiais de ovinos alimentados com as dietas experimentais

Item	Dia	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P		
		CTL	MON	1,09	2,18	3,27		Trat.	Dia	Trat. vs Dia
AGCC, mM/100 mM										
Acetato, %	7	53,75	50,69	51,89	50,48	50,48	0,94	0,87	0,02	0,26
	14	53,16	44,12	49,21	54,58	55,43	0,98			
	21	50,73	49,12	51,18	48,73	51,84	0,91			
Média		52,55	47,98	50,76	52,58	52,58				
Propionato, %	7	28,62	35,57	29,54	35,04	35,23	1,39	0,85	<0,01	0,70
	14	27,66	30,49	29,77	25,91	25,95	1,52			
	21	33,24	32,86	32,97	34,84	32,65	1,54			
Média		28,84	32,97	30,10	31,93	31,28				
Isobutirato, %	7	1,17a	0,95ab	0,89b	0,79b	0,89b	0,04	0,29	0,09	<0,01
	14	0,83b	0,54c	0,85b	1,23a	0,86b	0,06			
	21	0,80ab	0,82ab	0,95a	0,73ab	0,66b	0,04			
Média		0,93	0,77	0,89	0,92	0,80				
Butirato, %	7	11,07	8,81	11,08	9,60	8,95	0,56	0,95	<0,01	0,68
	14	14,50	11,06	14,20	14,42	13,85	0,72			
	21	11,68	14,04	9,90	12,43	11,35	0,94			
Média		12,41	11,30	11,73	12,15	11,38				
Isovalerato, %	7	2,41	1,62	1,85	1,42	1,90	0,11	0,42	<0,01	0,07
	14	2,09	1,36	1,98	2,47	2,61	0,17			
	21	1,62	1,53	1,57	1,31	1,52	0,12			
Média		2,04	1,50	1,80	1,73	2,01				
Valerato, %	7	2,38	2,37	2,67	1,45	2017	0,18	0,35	0,16	0,45
	14	1,62	1,57	2,93	1,42	1,27	0,21			
	21	1,90	1,63	2,40	1,99	1,95	0,19			
Média		1,97	1,86	2,70	1,62	1,95				

Item	Dia	Tratamentos ¹					EPM ²	(Conclusão)		
		CTL	MON	1,25	2,50	3,75		Trat.	Dia	Trat. vs Dia
Acetato:propionato	7	1,93	1,59	1,55	1,53	1,42	0,09			
	14	2,05	1,79	2,15	2,35	1,96	0,14			
	21	1,68	1,54	1,69	1,55	1,57	0,10	0,81	<0,01 0,73	
Média		1,88	1,64	1,80	1,81	1,65				
AGCC TOTAL, Mm/L	7	96,18	98,80	107,69	109,20	105,64	3,46			
	14	108,48	114,35	121,06	93,70	113,91	4,33			
	21	110,84	102,60	103,09	106,12	105,68	2,46	0,82	0,41 0,48	
Média		105,16	105,25	110,61	103,00	108,41				
Amônia, mg/dL	7	17,79	18,40	19,72	14,65	19,47	0,80			
	14	18,54	16,74	18,54	13,52	21,03	0,86			
	21	17,53	18,53	20,77	18,39	21,03	1,04	0,39	<0,01 0,38	
Média		17,86	17,89	19,68	15,52	21,96				
pH	7	5,97	5,91	5,78	5,74	5,86	0,06			
	14	5,62	5,43	5,55	5,87	5,71	0,05			
	21	5,77	5,93	5,65	5,76	5,84	0,05	0,55	0,04 0,13	
Média		5,78	5,76	5,66	5,79	5,80				

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

² EPM = erro padrão da média.

Figura 6 - Variação na concentração de isobutirato ao longo dos dias

Fonte: Dados da pesquisa

Hart et al. (2008) não verificaram efeito nas concentrações de isoácidos, já no presente estudo observou-se interação tratamento vs dia para concentração de isobutirato, efeito causado pelo catabolismo do aminoácido valina.

Para concentração de C₂ observou-se redução no dia 14 e aumento no dia 21 para CTL, MON e 1,09 mL de óleo essencial, respectivamente. Para as doses 2,18 e 3,27 mL de óleo essencial, observou-se aumento no dia 14 e redução na concentração de C₂ no dia 21 que mostra que estas duas doses foram mais efetivas em atuar sobre as bactérias gram positivas no rúmen após 14 dias de oferta das dietas.

Na concentração de C₃, observou-se redução no dia 14 e aumento no dia 21 para todos os tratamentos, o que confirma para as doses 2,18 e 3,27 mL de óleo essencial, terem sido eficiente em reduzir a concentração de C₂ e aumentar a concentração de C₃ após 14 dias de oferta das dietas. Este resultado mostra que o mecanismo de ação desse óleo essencial nas duas doses (2,18 e 3,27 mL/kg de matéria natural) ocorre principalmente após 14 dias de adaptação. A redução do C₃ para todos os tratamentos no dia 14, mostra que até este dia as bactérias Gram negativas do rúmen ainda não estavam adaptadas aos substratos e baixa atividade amilásica neste período (VALADARES FILHO; PINA, 2011).

Esta interação pode ser observada principalmente no dia 14 em que o tratamento 2,18 mL de óleo essencial de capim limão foi superior aos demais tratamentos, o que também pode ser confirmado pela maior concentração de isovalerato para este tratamento no dia 14. O que pode explicar este comportamento é que houve maior deaminação do aminoácido leucina neste período (VAN SOEST, 1994).

Observou-se que, no dia 14, o tratamento MON apresentou menor concentração de C_2 em relação aos tratamentos CTL e doses de óleo essencial de capim limão, acompanhado de maior concentração de C_3 , maior concentração de AGCC total e menor relação $C_2:C_3$. Estes dados estão de acordo com Russel (2002) afirmando que um dos principais efeitos da monensina é a redução na concentração de acetato e, consequentemente, redução na relação $C_2:C_3$.

Anassori et al. (2011) encontraram redução na concentração de C_2 para monensina e óleos essenciais de palha de alho e para o tratamento que recebeu óleo essencial de alho. Encontraram também aumentos significativos na concentração de propionato quando da adição desses aditivos, efeitos de tratamento, dia e interação tratamento vs dia.

No presente estudo, observamos somente efeito de dia para concentração de C_3 onde foram maiores no dia 7, diminuindo no dia 14 e aumentando novamente no dia 21 de coletas para todos os tratamentos, o que pode-se supor que, até o dia 14, os microrganismos de coloração Gram negativa do rúmen não estavam totalmente adaptados aos substratos das dietas experimentais.

Comportamento semelhante foi observado por Anassori et al. (2011) que também encontraram efeito de dia para propionato, acompanhado de efeito de dia e interação tratamento vs dia para esta variável para os tratamentos que receberam aditivos. Estes mesmos autores não verificaram efeito de dia para as variáveis de pH e AGCC total.

Tekype et al. (2013) observaram efeito nas concentrações de isobutirato e isovalerato como ocorreu no presente estudo. Neste contexto, observa-se que alguns óleos essenciais atuam na deaminação dos aminoácidos valina e leucina, respectivamente.

Os dados do presente estudo estão de acordo com Malecky et al. (2009), que não observaram diferenças na concentração de AGCC total em cabras em lactação

tratadas com misturas de monoterpenos nas doses de 0, 0.043 e 0.43 g/kg da matéria seca.

Fraser et al. (2007) não observaram efeito de tratamento nas concentrações de AGCC total e C₂, mais uma vez o que está de acordo com o presente experimento. Já Kholif et al. (2012) verificaram efeito nas concentrações de AGCC totais e na relação C₂:C₃, redução na concentração de C₂ e aumento na concentração de C₃ quando da adição de 2 mL de cinamaldeído. Este mesmo autor concluiu que os óleos essenciais possuem efeito dose dependente.

Houve efeito de dia ($P < 0,05$) para concentração de nitrogênio amoniacal no rumen. Não houve efeito de tratamento nem interação tratamento vs dia para esta variável. Observou-se que em todos os tratamentos houve aumento nas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen com o passar dos dias. Estes dados mostram que, com o passar dos dias, aumentou a atividade de bactérias super produtoras de amônia (CARDOZO et al., 2004).

Grobner et al. (1982) encontraram 15% de redução na concentração de amônia após sete dias de fermentação em meio de cultura contínuo com adição de 60 mg/kg de matéria seca de sarsaponina purificada (composto secundário da Yuca).

Também Ryan et al. (1997) reportaram que a adição de Yuca na dose de 6,25 mg/kg de matéria seca reduziu a concentração de N amoniacal de 17,0 para 15,6 mmol/L após 48 horas de incubação *in vitro*.

Wu et al. (1994), trabalhando com dose de 400 (mg/kg) de Yuca *in vivo*, não observaram efeito na concentração de amônia ruminal, o que está de acordo com o este experimento, confirmando o efeito dose dependente dos óleos essenciais neste parâmetro.

Um fato interessante nos dados do presente experimento é que a diminuição na concentração de amônia ruminal pode ser indicativo de aumento da síntese de proteína microbiana ou redução na degradação da proteína no rúmen (SANTOS; MENDONÇA, 2011). Porém, a concentração de amônia ruminal recomendada para máximo desaparecimento de substrato é de 24 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).

Observou-se efeito de dia para pH ruminal ($P = 0,04$), porém não houve efeito de tratamento nem interação tratamento vs dia para esta variável (Tabela 17). Esta ausência de efeito de tratamento no presente experimento pode ser explicada pela

ausência de efeito nos consumos de nutrientes e suas respectivas digestibilidades e/ou até mesmo animais corretamente adaptados às dietas que continham alto teor de milho, visto que o pH exerce uma pressão nos microrganismos ruminais sensíveis ao abaixamento do pH no período de adaptação às dietas que continham alto teor de concentrado. Quando o pH diminui, bactérias amilolíticas aumentam sua taxa de crescimento e multiplicação, enquanto que os microrganismos celulolíticos, diminuem. Assim, aumenta a atividade da amilase em relação à celulase, sendo sugerido por alguns autores (KAUFMANN et al., 1980; OWENS; GOETSCH, 1993) que o pH ótimo para atividade da amilase ruminal é 5,6. Os dados do presente estudo estão de acordo com esses autores.

Giannenas et al. (2011) não observaram efeito de tratamento para pH ruminal quando da adição de doses de timol, eugenol, guaiacol, limoneno e vanilina, da ordem de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de concentrado com média de 6,6.

Vários outros autores (MALECKY et al., 2009; WANG et al., 2009; ANASSORI et al., 2011; KHOLIF et al., 2012) não verificaram efeito de tratamento, nem de dia para pH ruminal. Ao contrário de Anassori et al. (2011) verificou-se efeito de dia para esta variável no presente estudo.

8.3.2 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

Não houve efeito de tratamento para nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo e digestibilidade dos nutrientes (Tabela 18). A ausência de efeito no CMS (kg/dia) pode ser explicada devido às dietas deste experimento não terem influenciado a palatabilidade, uma vez que o óleo essencial de capim limão possui sabor amargo e picante. Porém, observa-se redução no CMS (kg/dia) da ordem de 4,0% e 9,0% para MON e doses de óleo essencial de capim limão, respectivamente.

Estes dados estão de acordo com Nagaraja et al. (1997), que citaram que monesina reduziu o CMS (kg/dia) em 4,0% e que ionóforos, como monesina, atuam na regulação do CMS no que diz respeito a uma redução do mesmo.

Tabela 18 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes em ovinos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
Consumo, Kg/dia							
MS	1,70	1,64	1,55	1,48	1,62	0,04	0,28
MSPC (%)	2,82	2,80	2,66	2,60	2,84	0,07	0,56
MSPC ^{0,75} (g/kg)	78,40	77,20	73,30	70,83	77,85	1,60	0,47
FDN	0,35	0,34	0,32	0,30	0,33	0,01	0,27
FDNPC	0,58	0,57	0,54	0,53	0,58	0,02	0,54
MO	1,62	1,57	1,48	1,43	1,55	0,04	0,34
PB	0,26	0,25	0,24	0,23	0,25	0,01	0,29
EE	0,043	0,042	0,039	0,037	0,041	<0,01	0,25
Digestibilidade. %							
MS	83,85	82,20	85,31	84,68	84,01	0,47	0,33
FDN	87,85	86,83	87,14	88,48	89,31	0,48	0,58
MO	85,75	83,75	87,82	86,74	86,52	0,51	0,24
PB	92,41	93,42	93,07	92,54	92,15	0,21	0,37
EE	79,78	77,10	81,30	80,29	80,30	1,10	0,90

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

² EPM = erro padrão da média

MS = matéria seca; MSPC = matéria seca em % do peso corporal; MSPC^{0,75} = matéria seca em % do peso metabólico; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDNPC = fibra insolúvel em detergente neutro em % do peso corporal; MO = Matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo.

Os dados do presente estudo estão de acordo com Tekippe et al. (2013), que não verificaram efeitos sobre o CMS (kg/dia) nem para digestibilidade dos nutrientes no trato total para vacas em lactação, quando da adição de óleo essencial comercial.

Os principais efeitos dos óleos essenciais no rúmen é a redução da degradação da proteína e do amido, acompanhado da inibição na degradação dos aminoácidos devido à ação seletiva em certos microrganismos ruminais, especificamente em algumas bactérias em que o modo de ação proposto dos óleos essenciais é o efeito no padrão de colonização bacteriana em particular em substratos ricos em amido que entram no rúmen. O segundo modo de ação está envolvido na inibição da ação de bactérias atuantes na deaminação de aminoácidos (HART et al., 2008).

Hart et al. (2008) não verificaram efeito nas concentrações de isoácidos. Já no presente estudo observou-se interação tratamento vs dia para concentração de isobutirato, efeito causado pelo catabolismo do aminoácido valina.

8.3.3 Balanço de nitrogênio

Não houve efeito ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis relacionadas ao balanço de nitrogênio (Tabela 19).

Tabela 19 - Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com as dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
N ingerido, g/dia	41,35	40,06	37,99	36,23	39,73	1,00	0,29
N fezes, g/dia	8,72	8,08	6,47	7,38	8,19	0,34	0,34
N urina, g/dia	12,94	11,08	15,39	11,79	14,17	1,00	0,74
N retido g/dia	19,69	20,95	16,14	17,06	16,53	1,29	0,76
DAP ³ , (%)	78,92	79,72	83,17	79,53	79,32	0,71	0,40

¹ CTL = dieta controle negativo (sem adição de aditivos); MON = dieta controle positivo (adição de monensina sódica 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Capim limão (*Cymbopogon flexuosus*).

² EPM = erro padrão da média

³ DAP = digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio

A ausência de efeito pode ser explicada devido aos animais estarem em fase de crescimento, sem efeito no CMS e, CPB.

Não observou-se efeito na retenção de. Estes dados mostram eficiência no aporte de proteína para os animais, uma vez que os mesmos estavam em fase de crescimento. Essa retenção tende a ser positiva quando do balanço correto deste nutriente (VAN SOEST, 1994).

8.4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de Capim limão não afetou as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta totais e individuais.

Observou-se efeito de dia para maioria das variáveis ruminais no presente experimento e interação tratamento vs dia para isobutirato.

A inclusão deste óleo essencial não afetou o consumo e digestibilidade dos nutrientes.

Mais estudos são necessários para determinar doses diferentes das utilizadas no presente estudo.

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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 15thed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1141 p.
- 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.
- DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; McLAREN, J. B. Occurrence of rumen ciliate *Oligosotrich bubali* in domestic cattle (*Bos Taurus*). **Applied Environmental Microbiology**, v. 45, p. 1394-1397, 1983.
- 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.
- GROBNER, M. A.; JOHNSON, D. E.; GROOBAL, S. R.; BENZ, D. A. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. **Journal Animal Science**, v. 55, p.491-497, 1982.
- 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.
- KHAN, M. M. H.; CHAULDHRY, 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.
- 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.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N. K. Biodeterioration of some herbal raw materials by storage fungi and aflatoxin and assessment of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and its components as antifungal. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 63, n. 6, p. 712-716, 2009.

MAHMOUD, A. L. E. Antifungal action and antitoxigenic properties of some essential oil constituents. **Letter Applied Microbiology**, Oxford, v. 19, p. 110-113, 1994.

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**, v. 154, 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.

MAY, A.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B.; MORAES, A. R. A.; PINHEIRO, M. Q.; MARIO, M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 379-382, 2008.

MEHREZ, A. Z.; ØRSCOV, E. R.; McDONALD, I. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**, v. 38, n. 3, p. 437-443, 1977.

MENENDÉ, P.; ONELL, S.; MULLER, S.; DELLACASSA, B. Estudio de la actividad antimicrobiana de distintos aceites esenciales. In: JORNADA DE PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA, ANAIS SANTA MARIA: AUGM, 1993, falta local de realização do evento. 1993. p. 124.

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

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. AND DEMEYER, D. I. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. In: The rumen microbial ecosystem, pp 523-632. P. N. Hobson and C. S. Stewart editors.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites inhibit methanogenesis in the rumen. **Journal of Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.

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

RYAN, J. P.; QUINN, T.; LEEK, B. L. Comparision of effects of *Yucca schidigera* plant extract (De-Odorize) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture, on pH, short

chain fatty acids (SCFA) and ammonium, during fermentation of hay by sheep's ruminal fluid *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3222-3230, 1997.

SANTOS, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Effects of addition of an essential oil complex to the diet lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, p. 64-71, 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute. **Sas system for windows**. version 9. Cary: SAS, 2002.

SILVA, J. F. C. Mecanismos ~~r~~Reguladores do consumo. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2011. v. 2, p. 61-82, 2011.

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.

VAN DER MERWE, B. J.; DUGMORE, T. J.; WALSH, K. P. The effect of flavophospholipol (Flavomycin) on milk production and milk urea nitrogen concentration of grazing dairy cows. **South Africa Journal of Animal Science**, v. 31, n. 2, p. 101-105, 2001.

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

WANG, Y.; ALEXANDER, T. W.; McALLISTER, T. A. *In vitro* effects of monensin and Tween 80 on ruminal fermentation of barley grain: barley silage-based diets for beef cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 116, n. 3/4, p. 197-209, 2004.

WU, Z.; SADIK, M.; SLEIMAN, F. T.; SIMAS, J. M.; PESSARAKLI, M.; HUBER, J. T. Influence of yuca extract on ruminal metabolism in cows. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 1038-1042, 1994.

9 EXPERIMENTO V: DIGESTIBILIDADE DOS NUTRIENTES, PARÂMETROS RUMINAIS E BALANÇO DE NITROGÊNIO EM BORREGOS ALIMENTADOS COM DIETAS COM ALTO TEOR DE CONCENTRADO CONTENDO ÓLEO ESSENCIAL DA FOLHA DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius*)

RESUMO

Os objetivos deste experimento foram avaliar o efeito da inclusão do óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*), sobre os parâmetros de fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio. Os tratamentos experimentais foram os seguintes: controle negativo (sem óleo essencial), controle positivo (com adição de 25 ppm de monensina), 1,25 (1,25 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta), 2,50 (2,50 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta), 3,75 (3,75 mL de óleo essencial/kg de matéria natural da dieta). Trinta borregos castrados, da raça Santa Inês x Dorper, canulados no rúmen e com $53,23 \pm 12,05$ foram distribuídos em delineamento experimental tipo blocos completos casualizados com seis repetições por tratamento. Não houve efeito de tratamento para C₂, C₃, isobutirato, C₄, isovalerato, relação C₂:C₃ e AGCC totais. Houve efeito de tratamento ($P = 0,03$) para C₅, acompanhado por efeito de dia ($P < 0,01$). Houve tendência de efeito para tratamento ($P = 0,08$) na concentração de AGCC totais acompanhado de efeito de dia ($P < 0,01$) e, interação ($P = 0,01$) tratamento vs dia para esta variável. Tendência de efeito de dia ($P = 0,09$) para concentração de acetato. Não observou-se efeito de dia ($P > 0,05$) para as concentrações de propionato, isobutirato, butirato, isovalerato e, relação acetato/propionato. Observou-se tendência para efeito de tratamento ($P = 0,09$) acompanhado de efeito de dia ($P < 0,01$) na concentração de N-NH₃. Houve forte tendência para efeito de tratamento ($P = 0,06$) acompanhado de efeito de dia ($P = 0,04$) para pH ruminal. Não houve interação tratamento vs dia para pH ruminal. Não observou-se efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo. Tendência ($P = 0,06$) foi observada para o consumo de matéria seca em percentagem ao peso corporal. Não observou-se efeito para nenhuma das variáveis relacionadas à digestibilidade. Efeito para ingestão de N g/dia ($P < 0,01$) e para N retido g/dia ($P = 0,02$).

Palavras-chave: Óleo essencial. Fermentação ruminal. Digestibilidade. Balanço de nitrogênio. Ovinos. Aroeira folha.

ABSTRACT

The objectives of this experiment were to evaluate the effects of levels of inclusion of essential oils of Aroeira fruits (*Schinus Terebinthifolius*) on ruminal fermentation, nutrient digestibilities and nitrogen balancing. Thirty Lambs castrated with 53.23 ± 12.05 kg of body weight, crossbreed Santa Ines x Dorper, cannulated in the rumen were distributed in experimental randomized complete block design with six replications per treatment. The treatments were: negative control (no additive inclusion), positive control (with addition 25 ppm of monensin), (1.09; 2.18 and 3.27 mL of essential oil/kg of dry matter). There was no treatment effect ($P > 0.05$) for C₂, C₃, isobutyrate, C₄, isovalerate, C₂:C₃ ratio and total SCFA. There was no effect of treatment ($P = 0.03$) to valerate, accompanied by Day effect ($P < 0.01$). There was a tendency treatment effect ($P = 0.08$) concentrations of total SCFA accompanied day significant effect ($P < 0.01$) and interaction ($P = 0.01$) vs. treatment day on this variable. Has observed trend effect of day ($P = 0.09$) for the concentration of C₂. It was observed effect of day for concentrations of C₃, isobutyrate, C₄, isovalerate and C₂:C₃ ratio. Trend was observed for treatment effects ($P = 0.09$) effect of day together ($P < 0.01$). No interaction was observed vs. treatment day. There was a strong trend for treatment effect ($P = 0.06$) effect of day together ($P = 0.04$). No interaction was observed vs. treatment day ($P > 0.05$). No observed effect for the variables related to consumption. Only strong tendency ($P = 0.06$) was observed for dry matter intake as a percentage to body weight. Also there was no effect for the variables related digestibility. An effect to ingestion of N g / day ($P < 0.01$) in the CTL treatment was 12.73% higher than the MON and 30.0% higher dosages essential oil of Aroeira sheet. Effect was observed for N retained g / day ($P = 0.02$).

Key words: Essential oils. Rumen fermentation. Digestibility. Nitrogen balance. Sheep.

Leaf of Aroeira

9.1 INTRODUÇÃO

Atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, inseticida, antiprotozoários e antioxidante já foram observadas em muitos óleos essenciais (COWAN, 1999; BURT, 2004).

Óleos essenciais foram efetivos em manipular a fermentação ruminal (CASTILEJOS et al., 2006) *in vitro*. A *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) é espécie arbórea que ocorre do Nordeste ao Sul do Brasil, apresentando folhagem densa e verde-escura com frutos vermelhos em cachos Lorenzi (2002). Seus nomes populares mais comuns são aroeira-vermelha e aroeira-pimenta.

Possuem óleos essenciais tanto nas folhas, como nos frutos e tronco. As principais substâncias são: α -pineno, sabineno, β -pineno, α -felandreno, Δ -3-careno, β -felandreno, terpinen-4-ol, α -copaeno, germacreno-D, biciclogermacreno, β -cariofileno, δ -cadineno e α -cadinol Santos et al. (2007). Neste contexto, a avaliação da utilização de doses desse óleo essencial como manipulador da fermentação ruminal, poderá trazer respostas positivas para animais ruminantes.

Araújo (2010) trabalhando com aroeira folhas (*Schinus terebinthifolius*) em sistema *in vitro* observou aumento semelhante a monensina na concentração de C_3 em comparação ao tratamento controle (sem aditivo), aumento nas concentrações de C_4 , isoácidos e redução na relação C_2/C_3 mostrando o potencial deste óleo essencial em manipular alguns parâmetros da fermentação ruminal.

Vários trabalhos demonstraram atividade antimicrobiana da aroeira, no extrato aquoso Lima et al. (2004), extrato etanólico a 30% (MARTÍNEZ et al., 1996).

O Objetivo do presente estudo foi avaliar doses de óleo essencial de Aroeira folhas (*Schinus terebinthifolius*) sobre os parâmetros de fermentação ruminal, consumo e digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nas instalações 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, localizada em Piracicaba – SP (22° 42' 24" S e 47° 37' 53" O), Brasil.

9.2.1 Animais e Instalações

Animais providos com cânulas ruminais foram alojados individualmente em baias no período dos dias zero ao dia 18 e, em seguida, os animais permaneceram em gaiolas metabólicas para ensaios de metabolismo com dimensões de 1,30 x 0,55 m, providas de cocho, bebedouro e sistema para colheita de fezes e urina (Figura 7).

Figura 7 - Animais com arreios para colheita de fezes e urina totais em gaiolas metabólicas

Fonte: Arquivo pessoal

9.2.2 Delineamento Experimental

Trinta borregos, castrados F1 (Dorper x Santa Inês), canulados no rúmen com peso médio de $53,08 \pm 11,04$ kg e sete meses de idade foram utilizados no experimento. O período experimental teve duração de 23 dias, sendo 18 dias destinados à adaptação dos animais às dietas experimentais, quatro dias para a determinação do CMS, colheita de fezes e urina, e um dia (23º) para colheita de conteúdo ruminal. Os animais foram distribuídos em delineamento experimental em blocos completos casualizados (6 blocos e 5 tratamentos). Em todos os tratamentos os animais foram alimentados com uma dieta base (90% concentrado e 10% de volumoso) os tratamentos experimentais foram os que segue: 1) Controle (sem óleo essencial e sem monensina sódica); 2) dieta base adicionada com 1,09 mL de óleo do folha da aroeira/kg de matéria seca ou 1,25 mL/kg de matéria natural; 3) dieta base adicionada com 2,18 mL de óleo do folha da aroeira/kg de matéria seca ou 2,50 mL/kg de matéria natural; 4) dieta base adicionada com 3,27 mL de óleo do folha da aroeira/kg de matéria seca ou 3,75 mL/kg de matéria natural e, 5) Rumensin 200 (Monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural).

9.2.3 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 1 cm. Em seguida, foram misturados ao farelo de soja, milho moído calcário, mistura mineral e, no caso do controle positivo, à monensina sódica (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 foram adicionados na dieta total no momento da oferta.

Todos os dias do período experimental, as rações foram pesadas em balança eletrônica de precisão e ofertadas *ad libitum* 2 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.

9.2.4 Coletas e análises de amostras de conteúdo ruminal

Nos dias 0 (dia anterior ao início do fornecimento das dietas experimentais), 7, 14 e 21 foi colhido conteúdo ruminal. As colheitas foram realizadas zero horas (antes do fornecimento da ração), 3, 6 e 9 horas após o fornecimento das rações do período da manhã. Logo após a colheita, as amostras foram filtradas em tecido de nylon, sendo em seguida realizada a medição imediata do pH em potenciômetro digital (DIGIMED® DM20). Do fluido filtrado, foram retiradas duas alíquotas de 25 mL e foram imediatamente armazenadas em frascos plásticos e congeladas a -20 °C para posterior determinação da concentração de AGCC e N amoniacal.

9.2.5 Análises laboratorial: ração oferta, sobras e fezes

Depois de descongeladas, as amostras das rações ofertadas, sobras e fezes foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas. Em seguida todas as amostras 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 orgânica (MO) foi obtida por meio da incineração da amostra em forno 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). O teor de extrato etéreo foi determinado utilizando um aparelho Leco TFE2000 (LECO® Corp.). A concentração de FDN foi determinada conforme Van Soest (1991), utilizando α -amilase termoestável e sulfito de sódio, em

um aparelho Ankom A 2000 (Ankom Tech. Corp., Macedon, NY). O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado pelo método Microkjeldahl (AOAC, 1997).

A digestibilidade dos nutrientes no trato digestivo total foi calculada subtraindo-se da quantidade consumida de cada nutriente pela excreção fecal do respectivo nutriente. O N retido foi calculado pela diferença entre o N consumido e o excretado nas fezes e urina, o N retido foi expresso em % do N consumido e em % do N digerido.

As proporções dos ingredientes e a composição química das dietas experimentais encontram-se na (Tabela 20) em que, o tratamento CTL foi acrescido de monensina sódica ou respectivas doses do óleo essencial de Aroeira folhas (*Schinus terebinthifolius*).

Tabela 20 - Proporção dos ingredientes e composição química das dietas experimentais, % da MS

Item	Tratamentos ¹				
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27
Ingredientes					
Feno "coastcross"	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Farelo de soja	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00
Milho moído	70,00	70,00	70,00	70,00	70,00
Cloreto amônio	0,35	0,35	0,35	0,35	0,35
Calcáreo	1,65	1,65	1,65	1,65	1,65
Mistura mineral ²	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Óleo (mL/Kg MS)	0,00	0,00	109,00	218,00	327,00
Monensina (ppm)	0,00	25,00	0,00	0,00	0,00
Composição química					
MS (% da MO)	87,50	87,50	87,50	87,50	87,50
Matéria orgânica	95,60	95,60	95,60	95,60	95,60
Proteína bruta	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
Extrato etéreo	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60
FDN ³	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*).

²composição: Ca 13,4%, P 7,5%, Mg 1%, S 7%, Cl 21,8%, Na 14,5%, Mn 1100 mg/kg, Fe 500 mg/kg, Zn 4600 mg/kg, Cu 300 mg/kg, Co 40 mg/kg, I 55 mg/kg, Se 30 mg/kg.

³ Fibra insolúvel em detergente neutro

9.2.6 Composição do óleo essencial de Aroeira folhas (*Schinus terebinthifolius*)

A composição do óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*) foi determinada no laboratório de Química e análise de alimentos da Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz da Universidade de São Paulo em cromatógrafo equipado com coluna RTX 5MS com 30 m de comprimento e 0,25 mm de espessura com temperatura inicial de 40 °C por 8 minutos (rampa 1) aumentando 3 °C por minuto até 180 °C (rampa 2) e 20 °C até 230 °C (rampa 3) por um período total de 77,17 minutos (Tabela 21).

Tabela 21 - Composição do óleo essencial de Aroeira folhas (*Schinus terebinthifolius*)

Composto	Aroeira Folhas
	% relative
α Pineno	40,16
β pineno	11,26
1,6 octadieno	2,83
α felandreno	3,95
Δ - 3- Careno	0,81
Cimeno	10,38
α -Terpineno	0,42
P-cimeno	16,15
Limoneno	0,54
Terpinoleno	0,51
α copaeno	0,27
Muroleno gama	6,94
Cariofileno	0,54
Germacreno- D	0,59
Cadineno Gama	2,64
α - elemol	0,28
Viridiflorol	0,44
Não identificados	1,29

9.2.7 Colheita de sobras, amostras de fezes e urina

Após o período de adaptação, nos dias 19, 20, 21 e 22, às 7:00 horas da manhã, a produção fecal e o volume de urina referente ao dia anterior foi mensurado. As fezes foram pesadas em balança de precisão e a urina medida em proveta graduada. Em seguida, foram colhidas amostras (10%) da produção fecal e de urina

diária. A colheita de urina foi realizada automaticamente pelos coletores das gaiolas em vasilhames contendo ácido clorídrico 6N, 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 medido o consumo de ração e com base no consumo diário de ração foi realizada a oferta do dia posterior, de modo que as sobras não fossem superiores a 10%, sendo colhida amostras das mesmas no último dia para análises bromatológica, visando determinar a digestibilidade aparente total dos nutrientes.

Todos os animais foram pesados no primeiro e no último dia de cada período experimental, sem jejum alimentar, para avaliação da variação do peso corporal.

9.2.8 AGCC e N - amoniacal

Para determinação dos AGCC; 1,2 mL de fluido ruminal adicionado com 0,3 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% e 0,15 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno) foram centrifugados (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA) por 30 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 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-NH₃ foi determinada pelo método colorimétrico, adaptado para leitura em leitor de microplacas (BIO – RAD, Hercules, CA), utilizando-se filtro para absorvância de 550 nm.

9.2.9 Análise estatística

Os dados de características de fermentação ruminal do experimento foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do SAS (2002). As médias de cada tratamento foram obtidas utilizando o comando LSMEANS, em que o efeito de dia foi significativo quando analisado através da comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. A interação tratamento vs dia também foi avaliada na análise de variância e, quando significativa, foi desdobrada através de comparação de médias utilizando o teste de Tukey com significância de 5%. Foi estabelecido nível aceito para tendência entre 5 e 10%. Os efeitos de semana e interação dieta x semana foram definidos pelo teste F da análise de variância.

Os dados de consumo, digestibilidade dos nutrientes e balanço de nitrogênio foram analisados utilizando o procedimento “MIXED” do SAS (2002). As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. Os efeitos foram declarados significativos quando $P < 0,05$. O modelo estatístico utilizado para análise dos dados de consumo e digestibilidade dos nutrientes, foi o que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + E_{ij}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco acaso ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5) e E_{ij} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

Os dados de características fermentação ruminal, foram analisados conforme o modelo que segue: $Y = \mu + B_i + D_j + S_{ij} + T_k + (DT)_{JK} + E_{ijk}$, em que μ = média geral, B_i = efeito de bloco ($i = 1$ a 6), D_j = efeito de dieta ($j = 1$ a 5), S_{ij} = erro residual associado ao efeito do animal (blocos x dieta), T_k = efeito de dia ($k = 1$ a 5), $(DT)_{JK}$ = interação entre dieta x dia e E_{ijk} = erro residual. Bloco foi incluído como efeito aleatório.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.3.1 Parâmetros ruminais

Não observou-se efeito de tratamento para acetato, propionato, isobutirato, butirato, isovalerato, relação acetato/propionato e AGCC totais. Entretanto, houve efeito de tratamento ($P = 0,03$) para C_5 , acompanhado por efeito de dia ($P < 0,01$).

Observou-se tendência de efeito de tratamento ($P = 0,08$) na concentração de AGCC totais acompanhado de efeito de dia ($P < 0,01$) e, interação ($P = 0,01$) tratamento vs dia para esta variável (Tabela 22 e Figura 8). Observou-se tendência de efeito de dia ($P = 0,09$) para concentração de C_2 . Não observou-se efeito de dia para as concentrações de C_3 , isobutirato, C_4 , isovalerato e, relação $C_2:C_3$.

Para concentração de C_4 , observa-se efeito de tratamento ($P = 0,05$) em que MON e doses de óleo essencial foram 51,0% superiores que CTL no dia 7. Este aumento na concentração de C_4 pode ter sido devido aos microrganismos terem utilizado a via inversa a β - oxidação em que são utilizadas duas moléculas de C_2 , porém, a síntese de C_4 a partir do C_2 , embora sem benefícios para a bactéria, resulta na regeneração de cofatores oxidados permitindo assim o prosseguimento do processo fermentativo (FAHEY; BERGER, 1993). Já para o dia 14, não observou-se efeito entre os tratamentos, porém, observou-se aumento para CTL no dia 14, reduzindo novamente no dia 21. Para MON e dose 1,09 mL de óleo essencial observou-se manutenção na concentração de C_4 e, para as dosagens 2,50 e 3,75 mL de óleo essencial, observou-se redução na concentração de C_4 a partir do dia 7.

Para concentração de C_5 CTL foi diferente do MON e 3,27, mantendo sua concentração mais alta até o dia 21 em relação aos demais tratamentos. Já para MON e ionóforos, observou-se aumento até o dia 14 e, diminuição de C_5 no dia 21.

Observa-se aumento na concentração de AGCC total a partir do dia 14 e a manutenção até o dia 21 para 2,18 e 3,27 mL de óleo essencial em relação aos demais tratamentos.

(Continua)

Tabela 22 - Parâmetros ruminais de ovinos alimentados com dietas experimentais

Item	Dia	Tratamentos ¹				EPM ²	Valor de p			
		CTL	MON	1,09	2,18		3,27	Trat.	Dia	Trat vs Dia
AGCC, mM/100 mM										
Acetato, %	7	49,51	49,17	48,88	44,09	48,52	1,16	0,60	0,09	0,27
	14	45,89	49,75	51,16	52,56	46,73	1,09			
	21	49,13	48,96	53,75	53,39	51,41	0,99			
Média		48,17	49,30	51,26	50,01	48,88				
Propionato, %	7	37,13	35,08	34,40	33,49	28,40	1,81	0,16	0,94	0,77
	14	35,18	33,28	29,95	30,85	38,42	1,73			
	21	35,60	34,43	29,23	30,31	34,91	1,59			
Média		35,97	34,26	31,19	30,55	34,00				
Isobutirato, %	7	0,75	0,82	0,89	0,83	0,98	0,05	0,87	0,79	0,76
	14	0,83	0,79	0,92	0,84	0,90	0,05			
	21	0,79	0,87	0,86	0,88	0,67	0,04			
Média		0,79	0,83	0,89	0,85	0,85				
Butirato, %	7	7,40	11,88	12,91	16,84	16,06	0,79	0,05	0,02	0,35
	14	12,13	11,95	12,31	11,56	9,33	0,79			
	21	10,03	12,96	12,36	12,03	9,51	0,71			
Média		9,85	12,26	12,52	13,47	11,63				
Isovalerato, %	7	1,64	1,93	2,28	2,29	2,74	0,22	0,80	0,21	0,61
	14	1,63	1,97	1,98	2,44	2,30	0,26			
	21	1,91	1,69	2,19	1,59	1,52	0,17			
Média		1,72	1,86	2,15	2,11	2,18				
Valerato, %	7	3,22 ^a	1,37 ^c	1,78 ^{abc}	2,65 ^{ab}	2,58 ^{bc}	0,21	0,03	<0,01	0,26
	14	3,30 ^a	1,64 ^c	3,03 ^{abc}	2,39 ^{ab}	2,13 ^{bc}	0,23			
	21	2,19 ^a	1,35 ^c	1,71 ^{abc}	1,99 ^{ab}	1,50 ^{bc}	0,18			
Média		2,90	1,45	2,17	2,34	2,07				

Item	Dia	Tratamentos ¹					EPM ²	(Conclusão)		
		CTL	MON	1,09	2,18	3,27		Trat.	Dia	Trat vs Dia
AGCC, mM/100 mM										
Acetato/propionato	7	1,53	1,43	1,57	1,59	1,95	0,13	0,47	0,96	0,56
	14	1,37	1,77	1,93	1,81	1,31	0,13			
	21	1,59	1,48	1,88	1,58	1,44	0,10			
Média		1,49	1,56	1,79	1,66	1,56				
AGCC TOTAL, Mm/L	7	86,44 ^c	112,21 ^a	109,42 ^a	103,86 ^{ab}	89,84 ^{bc}	3,64	0,08	<0,01	0,01
	14	96,55 ^b	101,70 ^b	124,19 ^a	120,02 ^a	120,56 ^a	2,88			
	21	107,11	109,89	102,22	120,42	116,34	3,76			
		96,70	107,93	111,94	114,76	108,91				
Amônia, mg/dL	7	22,08	22,71	23,74	24,61	25,43	0,65	0,09	<0,01	0,59
	14	19,60	19,35	18,35	22,64	24,31	1,03			
	21	20,20	15,94	15,80	19,54	24,01	1,00			
Média		20,63	19,33	19,29	22,26	24,58				
pH	7	5,60	5,59	5,47	5,50	5,54	0,04	0,06	0,04	0,62
	14	5,43b	5,73	5,50	6,53	5,48	0,04			
	21	5,59	5,81	5,76	5,80	5,63	0,05			
Média		5,54	5,71	5,60	5,61	5,55				

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*).

² EPM = erro padrão da média

Os dados do presente estudo estão de acordo com Cardozo et al. (2004) trabalhando com óleo essencial de pimenta, não encontraram efeito na concentração individual dos AGCC, somente para a concentração de valerato. Porém, pode-se observar para a dose mais alta (3,27 mL/kg de matéria seca) que, a mesma foi efetiva ao se comparar com CTL e MON em manter a mesma concentração de propionato, acompanhada de menor relação acetato/propionato.

Trabalhando com três óleos essenciais (cinamaldeído, eugenol e capsicum), Targer e Krause et al. (2011) não encontraram efeito para o AGCC total.

Tekippe et al. (2011) trabalhando com vacas em lactação e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) na dose de 500 (g/dia), não observaram efeito na concentração de AGCC total, enquanto que em vacas Holandesas primíparas, ao testarem doses de óleo de orégano da ordem de 0; 250; 500 e 750 mg/vaca/dia, não observaram efeito na concentração de AGCC total (média 135,6 mM), acetato e propionato (médias 83,2 e 29,9 mM) respectivamente, porém, houve redução na concentração de butirato variando de 18,3 mM para o grupo controle a 17 mM para os grupos que foram suplementados com óleo de orégano (HRISTOV et al., 2013).

A dose mais alta (3,27 mL/kg de matéria seca) está de acordo com Manh et al. (2012) que trabalhou com vacas leiteiras secas, testando doses 0; 100 e 200 g/animal/dia de óleo essencial de eucalipto, observaram aumento na concentração de propionato (C₃) e redução na relação C₂:C₃ para o tratamento com dose mais alta do óleo.

Os dados do presente estudo em relação as concentrações de C₄ estão de acordo com Hristov et al. (2013), onde pode-se observar, mesmo sem efeito, menores concentrações para este AGCC em relação ao tratamento MON e as demais doses de óleo essencial de Aroeira folha utilizadas no presente estudo.

Figura 8 - Variação na concentração de ácidos graxos de cadeia curta totais ao longo dos dias

Fonte: Dados da pesquisa

Também Yang et al. (2010a), não observaram efeito na concentração de C_3 (média 21,6 mmol/L), butirato e AGCC total (média 16,3 e 118,5 mmol/L), respectivamente.

Yang et al. (2010b), suplementando bovinos de corte com monensina ou mistura de extratos de plantas (cinamaldeído, eugenol, capsaicina) nas doses de (46,7 mg/kg MS e mistura de extratos composto por cinamaldeído 266 mg/boi/dia com (170 g/kg), eugenol (280 g/kg) e 133 mg/novilho/dia de óleo de capsaicina, os autores não verificaram efeito das doses nas concentrações de AGCC total e AGCC individual.

Observou-se tendência para efeito de tratamento ($P = 0,09$) acompanhado de efeito de dia ($P < 0,01$) para concentração de $N-NH_3$ ruminal. Não observou-se interação tratamento vs dia.

Ryan et al. (1997) reportaram que a adição de Yuca na dose de 6,25 mg/kg reduziu a concentração de N amoniacal de 17,0 para 15,6 mmol/L após 48 horas de incubação *in vitro*.

Da mesma forma, Grobner et al. (1982) encontraram 15% de redução na concentração de amônia após sete dias de fermentação em meio de cultura contínuo com adição de 60 (mg/kg) de sarsaponina purificada (composto secundário da Yuca).

Redução de 6,0% na concentração de amônia ruminal em meio de cultura *in vitro* também foi observada por Wallace et al. (1992) trabalhando com dose de 10 (mg/L) de Yuca.

A adição de 7,5 (mg/kg) de cinamaldeído na matéria seca aumentou a concentração de amônia ruminal em 102,5% duas horas após a alimentação e reduziu numericamente a concentração de nitrogênio total 12,5% até oito horas de intervalo de alimentação. Os resultados do presente estudo indicam que o extrato de cinamaldeído Cardozo et al. (2004) e, o óleo essencial de Aroeira folha estimulam a proteólise e inibe a peptidólise.

Observou-se tendência para efeito de tratamento ($P = 0,06$) acompanhado de efeito de dia ($P = 0,04$) para pH ruminal. Não observou-se interação tratamento vs dia.

Esta tendência de efeito de tratamento pode ser explicada pelo fato dos microrganismos ruminais se adaptarem aos substratos ao longo do tempo o que pode ser observado redução do pH ruminal para o tratamento CTL e, aumento nos tratamentos MON e nos que receberam óleo essencial de Aroeira folhas.

Os dados do presente estudo estão de acordo com Targer e Krause (2011) que não verificaram efeito no pH ruminal com média de 5,72 ao testarem óleo essencial de cinamaldeído, eugenol e capsicum.

Tekippe et al. (2011) trabalhando com vacas em lactação e óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L) na dose de 500 (g/dia), não observaram efeito no pH ruminal.

Vários outros autores não verificaram efeito sobre o pH ruminal o que mostra que muitos dos óleos essenciais exercem pouco ou nenhum efeito sobre esta variável (NEWBOLD et al., 2004; YANG et al., 2010a,b; ANASSORI et al., 2011; MANH et al., 2012).

9.3.4 Consumo e digestibilidade dos nutrientes

Não observou-se efeito para nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo. Somente tendência ($P = 0,06$) foi observada para o consumo de matéria seca em percentagem ao peso corporal. Também não observou-se efeito para nenhuma das variáveis relacionadas a digestibilidade (Tabela 23).

A ausência de efeito na ingestão de MS (kg/dia), não foi influenciada pela adição dos aditivos uma vez que, algumas pesquisas indicam que óleos essenciais podem

influenciar a ingestão de alimentos pelos animais devido a estes óleos possuírem propriedades palatáveis (picantes, amargos) e fortes odores (CARDOZO et al., 2006; BENCHAAAR et al., 2008), porém, os dados do presente estudo não estão de acordo com estes autores, vuma vez que nenhuma das variáveis relacionadas ao consumo não foram afetadas.

Tabela 23 - Consumo e digestibilidade dos nutrientes de ovinos alimentados com dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de p
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
Consumo, kg							
MS	1,46	1,49	1,35	1,55	1,31	0,06	0,36
MSPC (%)	2,82	2,83	2,61	3,23	2,49	0,01	0,06
MSPC ^{0,75} (g/kg)	76,50	83,70	75,8	80,90	66,50	0,22	0,15
FDN	0,18	0,18	0,17	0,19	0,16	0,01	0,36
FDNPC	0,35	0,35	0,32	0,40	0,31	0,02	0,12
MO	1,39	1,42	1,29	1,48	1,26	0,06	0,36
PB	0,22	0,22	0,20	0,23	0,19	0,01	0,32
EE	0,038	0,037	0,035	0,040	0,035	<0,01	0,60
Digestibilidade, %							
MS	84,23	85,44	84,47	84,55	86,51	0,58	0,75
FDN	82,82	80,51	78,74	80,67	82,84	0,76	0,35
MO	86,34	87,12	87,02	86,78	88,37	0,54	0,83
PB	79,05	80,94	80,58	81,01	83,08	0,97	0,69
EE	87,73	87,32	86,95	87,11	87,93	0,36	0,92

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*).

² EPM = erro padrão da média

MS = matéria seca; MSPC (%) = matéria seca em % do peso corporal; MSPC^{0,75} = matéria seca em % do peso metabólico; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; FDNPC = fibra insolúvel em detergente neutro em % do peso corporal; MO = Matéria orgânica; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo.

Para o principal efeito dos óleos essenciais no rúmen tem sido sugerido a redução da degradação da proteína e do amido acompanhado da inibição da degradação dos aminoácidos devido a ação seletiva em certos microrganismos ruminais, especificamente em algumas bactérias em que o modo de ação proposto dos óleos essenciais é o efeito no padrão de colonização bacteriana em particular em

substratos ricos em amido que entram no rúmen e, o segundo modo de ação está envolvido na inibição da ação de bactérias atuantes na deaminação de aminoácidos (HART et al., 2008). Os dados do presente estudo não estão de acordo com estes autores, visto que, mesmo sem efeito estatístico, observa-se maior digestibilidade da proteína quando da presença do óleo essencial de Aroeira folhas e, confirmando estes dados, observa-se aumento nas concentrações de isobutirato e isovalerato.

Confirmando os dados do presente estudo, Targer e Krause (2011) avaliaram doses de óleos essenciais nos compostos de cinamaldeído, eugenol e pimenta para vacas em lactação, não encontraram nenhuma resposta na digestibilidade média da FDN, FDA, MS, MO, PB e amido, o que mais uma vez, contradiz a conclusão de (HART et al., 2008).

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

Em outro experimento, também com vacas em lactação suplementadas com cinamaldeído não houve diferença na digestibilidade da MS com médias de 64,0%, MO 66,1%, FDN 55,0%, FDA 48,0%, PB 61,2% (BENCHAAR et al., 2008a).

A digestibilidade dos nutrientes não foi afetada em vários estudos (MALECKY et al., 2009; MEYER et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

9.3.5 Balanço de nitrogênio

Houve efeito para ingestão de N (g/dia) ($P < 0,01$) em que o tratamento CTL foi 12,73% maior em relação ao MON e, 30,0% superior as dosagens de óleo essencial de Aroeira folha (Tabela 24).

Observou-se efeito para N retido (g/dia) ($P = 0,02$) onde observa-se para o tratamento CTL maior retenção devido a maior ingestão, porém mesmo sem efeito estatístico, observa-se para CTL maior excreção urinária de N.

A quantidade de N retido foi influenciada pelos tratamentos ($P = 0,02$) uma vez que os maiores valores foram obtidos para os tratamentos CTL e MON, com médias

de 20,46 e 16,78 g/dia, respectivamente, contra 10,10 (g/dia) em média para os tratamentos que receberam as doses de óleo essencial de Aroeira folha.

Tabela 24 - Balanço de nitrogênio de ovinos alimentados com dietas experimentais

Item	Tratamentos ¹					EPM ²	Valor de P
	CTL	MON	1,09	2,18	3,27		
N ingerido, g/dia	43,23 ^a	37,73 ^{ab}	31,74 ^{bc}	28,75 ^c	30,60 ^{bc}	1,39	<0,01
N fezes, g/dia	6,92	7,32	5,15	7,13	5,89	0,39	0,41
N urina, g/dia	15,85	13,62	15,74	14,43	14,05	1,03	0,97
N retido	20,46 ^a	16,78 ^{ab}	10,84 ^{bc}	8,81 ^c	10,66 ^{bc}	1,27	0,02
DAP ³	79,05 ^a	80,67 ^{ab}	80,58 ^a	81,00 ^b	83,08 ^{ab}	0,97	0,03

¹CTL= dieta controle negativo, sem adição de aditivos; MON = dieta controle positivo com adição de monensina sódica, 25 mg/kg de matéria natural; 1,09 = dieta com adição de 109 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 2,18 = dieta com adição de 218 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*); 3,27 = dieta com adição de 327 mL/100 Kg de MS de óleo essencial de Aroeira folha (*Schinus terebinthifolius*).

² EPM = erro padrão da média;

³DAP = digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio;

⁴ CND = consumo de nitrogênio digestível.

Observa-se efeito para digestibilidade aparente das fontes de nitrogênio (P = 0,03) onde a maior digestibilidade foi para o tratamento CTL e, a menor para o tratamento 2,18 mL de óleo essencial de Aroeira folha, com médias de 84,22 e 75,62%, respectivamente.

Também houve efeito (P < 0,01) no consumo de nitrogênio digestível, em que observou-se maior consumo no tratamento CTL com média de 36,32 (g/dia) e menor consumo para o tratamento 2,50 mL de óleo essencial de Aroeira folhas com 21,62 9g/dia), respectivamente.

O aumento no consumo de nitrogênio é associado com extensa saída de ureia do fígado associado com grande taxa de excreção urinária deste composto (VAN SOEST, 1994).

Os dados de balanço de nitrogênio do presente estudo estão de acordo com Van Soest (1994), onde, baixos consumos de nitrogênio são altamente reciclados e assim, menores concentrações deste composto é excretado na urina. O que também pode ser observado é que para nenhum dos tratamentos este balanço foi negativo.

9.4 CONCLUSÕES

Verifica-se que as doses de óleo essencial de aroeira folhas, foram capazes de manipular a fermentação ruminal em alguns aspectos. Não afetaram o consumo e digestibilidade dos nutrientes, houve balanço positivo de nitrogênio. Experimentos futuros com animais em desempenho com as doses utilizadas no presente experimento serão realizados.

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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington: AOAC, 1990. v. 1.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (AOAC). **Official methods of analysis**. 16th ed. Gaithersburg: AOAC, 1997. 1141 p.
- 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. **Journal of Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228. 2008a.
- 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**, v. 87, p. 413-419, 2007a.
- 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.
- 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**, v. 82, p. 3, 2004.
- CASTILLEJOS, I.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; LOSA, R. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, n. 1/2, p. 29-41, 2006.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- DEHORITY, B. A.; DAMRON, W. S.; McLAREN, J. B. Occurrence of rumen ciliate *Oligosotrich bubali* in domestic cattle (*Bos Taurus*). *Applied Environmental Microbiology*, v. 45, p. 1394-1397, 1983.

FAHEY, J. R.; BERGER, L. L. Los Carbohidratos en la nutrición de los ruminantes. In: CHURCH, D. C. (Ed.). **El ruminante: fisiología digestiva y nutrición**, Zaragoza: Acribia, 1993. 305-337.

GROBNER, M. A.; JOHNSON, D. E.; GROOBAL, S. R.; BENZ, D. A. Sarsaponin effects on in vitro continuous flow fermentation of a high grain diet. **Journal Animal Science**, v. 55, p.491-497, 1982.

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.

KRAUSE, D.O; DENMAN, S. E; MACKIE, I; MORRISON, MARK; RAE, A. L; ATTWOOD, G. T; McSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 663-693, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1, 384 p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

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.

MARTÍNEZ, M. J.; GONZÁLEZ, N. A.; BADELL, J. B. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebenthifolius* Raddi (Copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Havana, v. 1, n. 3, p. 37-39, 1996.

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

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**, v. 114, p. 105-112, 2004.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites inhibit methanogenesis in the rumen. **Journal of Phytochemistry**, v. 71, p. 1198-1222, 2010.

RYAN, J. P.; QUINN, T.; LEEK, B. L. Comparison of effects of *Yucca schidigera* plant extract (De-Odorize) and *Saccharomyces cerevisiae* yeast culture, on pH, short chain fatty acids (SCFA) and ammonium, during fermentation of hay by sheep's ruminal fluid in vitro. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3222-3230, 1997.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; AGOSTTINI, F.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOYNA, P.; DELLACASSA, E. Avaliação química mensal de três exemplares de *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1011-1013, 2007.

SANTOS, M. B.; ROBINSON, P. H.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 157, n. 1/2, p. 64-71, 2010.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. (SAS). Institute. **Sas system for windows**. version 9. Cary: SAS, 2002.

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.

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

WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings Nutritional Society**, v. 63, p. 621-629, 2004.

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