**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores
da fermentação ruminal *in vitro***

Rafael Canonenco de Araujo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

**Piracicaba
2010**

Rafael Canonenco de Araujo
Engenheiro Agrônomo

**Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores
da fermentação ruminal *in vitro***

Orientador:
Prof. Dr. **ALEXANDRE VAZ PIRES**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e
Pastagens

Piracicaba
2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Araujo, Rafael Canonenco de

Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro* / Rafael Canonenco de Araujo. - - Piracicaba, 2010.
178 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Aditivos alimentares para animal 2. Agentes antimicrobianos 3. Fermentação - Técnica
in vitro 4. Metabólitos secundários 5. Nutrição animal 6. Óleos essenciais 7. Rúmen
8. Ruminantes I. Título

CDD 636.2085
A663o

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha família e, em especial, aos meus pais Maria Cecília Canonenco de Araujo e José Luiz Salgueiro de Araujo. Por sempre me proporcionarem ambiente de amor e carinho, de estímulo ao conhecimento e por me oferecem todas as condições para que pudesse trilhar os caminhos que me trazem hoje até aqui.

Com grande orgulho de ser filho de vocês, ofereço.

Também em especial à minha namorada Thais Vieira Azzini. Pela amizade, companhia e exemplo de pessoa. E que venham as cenas dos próximos capítulos...

Com grande amor, também ofereço.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, casa que me acolhe desde os tempos de graduação.

Ao Departamento de Zootecnia e a todos os seus professores, pela possibilidade da realização deste curso e pela formação científica a mim oferecida.

Ao Prof. Alexandre Vaz Pires, pela grande amizade e confiança construídas ao longo de tanto tempo e por sempre me incentivar na árdua jornada que é fazer ciência.

Ao Prof. Adibe Luiz Abdalla, por possibilitar que este trabalho fosse realizado no Laboratório de Nutrição Animal (LANA/CENA/USP). Aos técnicos de laboratório Maria Regina R. S. Peçanha, Lécio A. Castilho e Joaquim Everaldo M. dos Santos, por sempre me ajudarem na condução dos experimentos. Aos alunos de pós-graduação do LANA (Bernardo B., Amr, Yosra, Patrícia Pimentel, Patrícia Godoy, Ronaldo, etc) pela convivência, amizade e grande ajuda durante os ensaios de produção de gás.

À Prof^ª. Ivanete Susin, por sua grande contribuição em minha formação profissional e pessoal.

Ao Prof. Sobhy M. A. Sallam (Univ. de Alexandria, Egito), pela sua enorme contribuição neste trabalho e por nossas longas e produtivas “brigas” científicas.

Ao Prof. Sergio Calsamiglia (Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha), pelos conhecimentos compartilhados quanto ao uso de óleos essenciais na nutrição de ruminantes, por me aceitar como aluno visitante em seu laboratório e, assim, possibilitar o aprendizado da técnica *in vitro* de fluxo contínuo duplo. Em especial à sua técnica María Rodríguez-Prado e seus alunos pós-graduação (Andreas Foskolos e Sara Cavini), pela grande amizade construída em tão curto espaço de tempo.

Ao Prof. Wilson Roberto Soares Mattos, pela motivação no início do planejamento deste trabalho e pelo exemplo de relação que possui com seus alunos. Também ao Prof. Burk A. Dehority (The Ohio State University), pelos comentários e sugestões durante o planejamento e condução deste projeto.

Ao Prof. Gerson Barreto Mourão, pelas valiosas ideias e pronta ajuda durante as análises estatísticas.

À Prof^a. Carla Maris Machado Bittar, pelas discussões a respeito deste trabalho e ajuda nas análises cromatográficas de ácidos graxos de cadeia curta.

Ao Prof. Tim A. McAllister (Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge), pelos valiosos comentários e correções no artigo sobre uso de brancos.

Aos técnicos de laboratório Carlos César Alves e Ana Paula Oeda Rodrigues, pela companhia, amizade e ajuda durante a fase das análises laboratoriais.

Ao Prof. Rodney A. F. Rodrigues e à Prof^a. Marry Ann Foglio do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, pelo fornecimento do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, pelas análises de cromatografia gasosa/espectrometria de massa e pelas discussões iniciais a respeito deste trabalho.

Aos grandes amigos Rafael C. M. Meneghini, Ricardo C. D. Goulart e Adir de Sá Neto, por nossa amizade e convivência mais do que agradável no “Lar dos Velhinhos”.

À República Covil, pelas grandes amizades que ali dentro cultivo.

Ao Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional, pelo financiamento de meu intercâmbio na Universitat Autònoma de Barcelona, Espanha.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo financiamento deste projeto.

Épigrafe

*“La science n’a pas de patrie, parce que le savoir
est le patrimoine de l’Humanité,
le flambeau qui éclaire le monde”.*

*“Dans les champs de l’observation,
le hasard ne favorise que
les esprits préparés”.*

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
Referências	21
2.1 Definição e caracterização química dos óleos essenciais.....	23
2.2 Mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais	25
2.3 Utilização de óleos essenciais na nutrição de ruminantes	29
2.3.1 Perfil de ácidos graxos de cadeia curta e pH ruminal	30
2.3.2 Metanogênese.....	32
2.3.3 Metabolismo protéico e população de protozoários	35
2.3.4 Desempenho animal	37
2.3.5 Limitações práticas ao uso de óleos essenciais.....	42
2.3.6 Outras aplicações na produção de ruminantes	46
2.4 As plantas selecionadas, seus óleos essenciais e ação antimicrobiana	47
2.4.1 Fatores que influenciam a composição dos óleos essenciais	47
2.4.2 Critérios de seleção.....	48
2.4.3 Erva-baleeira - <i>Cordia verbenacea</i> DC. (Boraginaceae)	49
2.4.4 Aroeira vermelha - <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi (Anacardiaceae).....	50
2.4.5 Capim cidreira - <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf (Poaceae)	51
2.4.6 Capim limão - <i>Cymbopogon flexuosus</i> (DC.) Stapf (Poaceae).....	52
2.4.7 Citronela - <i>Cymbopogon winterianum</i> Jowitt. (Poaceae).....	52
2.4.8 Macela - <i>Achyrocline satureoides</i> (Lam.) DC. (Asteraceae).....	53
2.4.9 Guaco - <i>Mikania glomerata</i> Spreng. (Asteraceae)	53
2.4.10 Carqueja - <i>Baccharis cylindrica</i> (Less.) DC. (Asteraceae).....	53
2.4.11 Arnica - <i>Lychnophora pinaster</i> Mart. (Asteraceae)	54
2.4.12 Copaibás - <i>Copaifera</i> sp. (Leguminosae - Caesalpinioideae)	54
2.5 A técnica <i>in vitro</i> de produção de gás	55

Referências.....	57
3 EFEITO DO ETANOL NA FERMENTAÇÃO RUMINAL <i>IN VITRO</i> : UMA ABORDAGEM SOBRE SEU USO EM EXPERIMENTOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E MONENSINA	77
Resumo	77
Abstract.....	77
3.1 Introdução.....	78
3.2 Material e Métodos	79
3.3 Resultados e discussão	84
3.4 Conclusão.....	91
Referências.....	91
4 O USO DE BRANCOS NA DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS PRODUÇÕES LÍQUIDAS DE GÁS E METANO AO SE UTILIZAR MODIFICADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL	97
Resumo	97
Abstract.....	97
4.1 Introdução.....	98
4.2 Material e Métodos	99
4.3 Resultados.....	105
4.3.1 Experimento 1 – monensina	105
4.3.2 Experimento 2 – compostos secundários de plantas.....	107
4.4 Discussão	110
4.5 Conclusão.....	113
Referências.....	114
5 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL <i>IN VITRO</i>	117
Resumo	117
Abstract.....	117
5.1 Introdução.....	118
5.2 Material e Métodos	119

5.3 Resultados e discussão.....	129
5.3.1 Monensina como controle positivo	129
5.3.2 Ensaio com óleo essencial de erva-baleeira	134
5.3.3 Ensaio com óleos essenciais de aroeira vermelha (folhas e frutos).....	138
5.3.4 Ensaio com óleos essenciais de capim cidreira, capim limão e citronela.....	145
5.3.5 Ensaio com óleos essenciais de macela, guaco, carqueja e arnica.....	153
5.3.6 Ensaio com óleos resinóides de copaíba mari-mari, copaíba angelim, copaíba zoró e copaíba vermelha.....	162
5.4 Conclusão	168
Referências	169

RESUMO

Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro*

Na tentativa de reproduzir os benefícios ruminais dos ionóforos, pesquisadores exploram as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários dos vegetais. Técnicas *in vitro* de produção de gás são amplamente utilizadas nas etapas iniciais de pesquisa. Óleos essenciais são compostos hidrofóbicos, sendo comum sua diluição com etanol em experimentos *in vitro*. Etanol é metabolizado no ambiente ruminal, havendo principalmente produção de acetato. No primeiro experimento, o objetivo foi avaliar o efeito de 10, 100 e 1000 μL de etanol em 75 mL de fluido ruminal tamponado, correspondendo a 0,13; 1,3 e 13,3 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. As inclusões de 100 e 1000 μL de etanol alteraram a fermentação ruminal *in vitro*. A dose de 10 μL não afetou a fermentação, exceto pela tendência ($P < 0,10$) de aumento na produção de gás ou na concentração de valerato ao se incubar feno ou dieta de alto concentrado, respectivamente. Sugere-se a utilização da menor dose possível de etanol (0,13 $\mu\text{L/mL}$). O segundo experimento trata do uso de brancos (frascos sem substrato, contendo somente inóculo ruminal e meio de incubação) em experimentos *in vitro* para se estimar as produções líquidas de gás e metano (CH_4), assim como a degradação líquida da matéria orgânica incubada. Foi demonstrado que aditivos ruminais (monensina, carvarol, eugenol) afetaram a fermentação de frascos contendo substrato assim como dos brancos. Dessa forma, brancos específicos (brancos contendo aditivo) são necessários ao se avaliar aditivos ruminais sob condições *in vitro*. No terceiro experimento, incubações *in vitro* foram conduzidas para triar os efeitos de óleos essenciais sobre a fermentação ruminal. Foram selecionados os óleos essenciais de **erva-baleeira** (*Cordia verbenacea*), **aroeira-vermelha** (*Schinus terebinthifolius*; óleo extraído das folhas ou frutos), **macela** (*Achyrocline satureoides*), **guaco** (*Mikania glomerata*), **carqueja** (*Baccharis cylindrica*), **arnica** (*Lychnophora pinaster*), **capim cidreira** (*Cymbopogon citratus*), **capim limão** (*Cymbopogon flexuosus*) e **citronela** (*Cymbopogon winterianum*). Foram também incluídos os óleos resinóides de **copaíba mari-mari** (*Copaifera reticulata*), **copaíba angelim** (*Copaifera multijuga*), **copaíba zoró** (*Copaifera langsdorfii*) e **copaíba vermelha** (*Copaifera langsdorfii*). Os óleos de erva-baleeira, macela e as quatro oleoresinas de copaíba pouco alteraram a fermentação ruminal. Os outros óleos apresentaram claro efeito antimicrobiano, evidenciado pela queda na degradação de substrato. Os resultados mais promissores foram observados ao se incubar dieta de alto concentrado com inóculo adaptado a esta dieta. Os óleos essenciais que apresentaram os melhores resultados foram aroeira vermelha (folhas e frutos) e arnica. Sob a condição de alto concentrado, esses óleos aumentaram a concentração de propionato, reduziram a relação acetato:propionato e/ou diminuíram a produção de CH_4 . Os óleos essenciais de aroeira vermelha (extraídos das folhas e dos frutos) e arnica foram selecionados para subsequente avaliação *in vivo*.

Palavras-chave: Aditivos; Brancos; Compostos secundários de plantas; Etanol; Extratos de plantas; Metano; Monensina; Terpenóides

ABSTRACT

Essential oils from Brazilian plants as *in vitro* rumen fermentation modifiers

In an attempt to reproduce the benefits of ionophores on rumen fermentation, researchers have been exploiting the antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *In vitro* gas production techniques are widely used during the screening phase. Essential oils are hydrophobic compounds, being usual its dilution in ethanol for *in vitro* experiments. In the rumen environment, ethanol is metabolized mostly to acetate. In the first experiment, the objective was to evaluate the effects of 10, 100 and 1000 μL of ethanol in 75 mL of buffered rumen fluid, corresponding to 0.13, 1.3, and 13.3 $\mu\text{L/mL}$, respectively. Ethanol inclusions of 100 and 1000 μL affected *in vitro* rumen fermentation. The inclusion of 10 μL of ethanol had no effects on fermentation, except for the tendency ($P < 0.10$) of gas production increase or valerate increase when incubating hay or a high-concentrate diet, respectively. It is suggested that ethanol should be included at the lowest dose as possible, which corresponded to 10 μL (0.13 $\mu\text{L/mL}$) in our conditions. The second experiment dealt with the use of blanks (flasks without substrate, containing only inoculum and incubation medium) in *in vitro* experiments to estimate net production of gas and methane (CH_4), as well as net degradation of organic matter incubated. It was demonstrated that rumen additives (monensin, carvacrol, eugenol) affected fermentation of flasks containing substrate and blanks. Thus, specific blanks (blanks containing additive) are necessary when rumen additives are evaluated *in vitro*. In the third experiment, *in vitro* incubations were conducted to screen the effects of essential oils on rumen fermentation. The selected essential oils were: **cordia** (*Cordia verbenacea*), **Brazilian peppertree** (*Schinus terebinthifolius*; extracted from leaves or fruits), **macela** (*Achyrocline satureoides*), **guaco** (*Mikania glomerata*), **carqueja** (*Baccharis cylindrica*), **arnica** (*Lychnophora pinaster*), **West Indian lemongrass** (*Cymbopogon citratus*), **East Indian lemongrass** (*Cymbopogon flexuosus*), and **citronella** (*Cymbopogon winterianum*). Oleoresins from **copaiba mari-mari** (*Copaifera reticulata*), **copaiba angelim** (*Copaifera multijuga*), **copaiba zoro** (*Copaifera langsdorfii*), and **copaiba vermelha** (*Copaifera langsdorfii*) were also included. The essential oils from cordia, macela and all copaiba oleoresins had little effect on *in vitro* rumen fermentation. The remaining essential oils showed a clear antimicrobial effect, mainly on truly degraded organic matter. The most promising results were obtained when using high-concentrate diet and inoculum from animals fed this same diet. The best results were observed for Brazilian peppertree (leaves and fruits) and arnica essential oils. In the condition of high-concentrate diet, these oils increased propionate concentration, had lower acetate to propionate ratio, and/or reduced CH_4 production. The essential oils from Brazilian peppertree (leaves and fruits) and arnica were selected for further *in vivo* evaluation.

Keywords: Additives; Blanks; Ethanol; Methane; Monensin; Plant extracts; Plant secondary compounds; Terpenoids

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
ATP	trifosfato de adenosina
C ₂ :C ₃	relação acetato:propionato
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CH ₄	metano
CMS	consumo de matéria seca
DNA	ácido desoxirribonucleico
DVMO	degradação verdadeira da matéria orgânica
DVMS	degradação verdadeira da matéria seca
EPM	erro padrão da média
EE	extrato etéreo
FDA	fibra insolúvel em detergente ácido
FDN	fibra insolúvel em detergente neutro
GMD	ganho médio diário
HMG-CoA	enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase
MO	matéria orgânica
MS	matéria seca
N	nitrogênio
NH ₃	amônia
pH	potencial hidrogeniônico
PB	proteína bruta
RNA	ácido ribonucleico

1 INTRODUÇÃO

O uso de ionóforos é, muito provavelmente, o mais bem sucedido exemplo de como a manipulação da fermentação ruminal contribui para o aumento do desempenho animal. A monensina sódica, por exemplo, é utilizada comercialmente na produção de ruminantes há pelo menos quatro décadas. Seu uso, dentre outros efeitos, melhora a eficiência alimentar, diminui a produção de metano (CH₄) e minimiza os riscos de ocorrência de distúrbios metabólicos (RUSSELL; STROBEL, 1989). Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora.

Cresce a importância da segurança alimentar como atributo decisivo no momento da compra, com progressiva demanda por produtos saudáveis e produzidos sob preceitos ambientais. Apoiada no princípio da precaução, a União Europeia banuiu em 2006 os antibióticos como promotores de crescimento animal, estando os ionóforos incluídos na lista. A alegação: a possível presença de resíduos no leite e na carne, além da maior probabilidade de aparecimento de resistência bacteriana aos antibióticos usados na medicina humana (OJEU, 2003). Contudo, ainda inexistente base científica justificando que ionóforos aumentem os riscos de transferência cruzada de resistência microbiana (CALLAWAY et al., 2003; RUSSELL; HOULIHAN, 2003).

É evidente o papel da União Europeia como formadora de opinião. É plausível admitir que exportadores mundiais de carne serão pressionados a seguir esta decisão em futuro próximo. Frente ao duelo entre questões econômicas e de saúde pública, há crescente interesse científico por alternativas que mimetizem os efeitos dos ionóforos, sendo seguras ao consumo humano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade consumidora. Dentre as diversas opções, compostos secundários dos vegetais têm grande potencial de utilização.

Muitos compostos secundários possuem atividade antimicrobiana cientificamente comprovada. Concomitantemente, grande parte deles possui *status* GRAS (*generally recognized as safe*) para consumo humano (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004), o que possibilita ser uma alternativa natural e segura. Dentre suas principais vantagens está o baixo risco de aparecimento de resistência microbiana, já que

compostos secundários apresentam na maioria das vezes diversos princípios ativos, o que confere diferentes modos de ação (ACAMOVIC; BROOKER, 2005).

Pesquisas sobre a aplicação de compostos secundários na alimentação de ruminantes são realidade. Ótimos exemplos são os estudos que triaram os efeitos de plantas com propriedades antimicrobianas sobre a fermentação ruminal *in vitro* (BODAS et al., 2008; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008). Produtos patenteados já existem no mercado, como o Biostar[®] (Phytosynthèse, França) à base de alcachofra (*Cynara cardunculus* subesp. *Scolymus*), ginseng siberiano (*Eleutherococcus senticosus*) e feno-grego (*Trigonella foenum graceum*); o Crina[®] Ruminants (DSM Nutritional Products Ltd., Suíça) à base dos óleos essenciais timol, limoneno e guaiacol; e o Vertan[®] (IDENA, França) à base de timol, eugenol, vanilina e limoneno.

Questões relacionadas às mudanças climáticas pressionam a agricultura a ser cada vez mais eficiente e menos danosa ao ambiente. No Brasil, a fermentação entérica é responsável por 12% das emissões totais de CO₂-eq (CERRI et al., 2009). Alguns compostos secundários podem reduzir a produção de CH₄ causada pela fermentação ruminal, sendo uma alternativa frente aos novos desafios da pecuária.

Dessa forma, foram selecionados óleos essenciais de plantas brasileiras, ou de ampla utilização por nossa cultura, que apresentassem estudos científicos sobre suas propriedades antimicrobianas. Foram eles: óleos essenciais de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* DC.); aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*), cujo óleo foi extraído das folhas ou frutos; capim cidreira (*Cymbopogon citratus*); capim limão (*Cymbopogon flexuosus*); citronela (*Cymbopogon winterianus*); macela (*Achyrocline satureoides*); guaco (*Mikania glomerata*); carqueja (*Baccharis cylindrica*) e arnica (*Lychnophora pinaster*). Foram também incluídos os óleos resinóides de copaíba mari-mari (*Copaifera reticulata*), copaíba angelim (*Copaifera multijuga*), copaíba zoró (*Copaifera langsdorfii*) e copaíba vermelha (*Copaifera langsdorfii*).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dessas substâncias como manipuladoras da fermentação ruminal utilizando a técnica *in vitro* de produção de gás. Almejou-se selecionar as substâncias mais promissoras, a fim de serem posteriormente avaliadas sob condições *in vivo*.

Referências

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

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; RYCHLIK, J.L.; GENOVESE, K.J.; POOLE, T.L.; JUNG, Y.S.; BISCHOFF, K.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2003.

CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F.; GALDOS, M.V.; CERRI, C.E.P.; FEIGL, B.J.; BERNOUX, M. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 6, p. 831-843, 2009.

BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, A.B.; WALLACE, R.J.; GONZÁLEZ, J.S. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 245-258, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for industry**: frequently asked questions about GRAS. Food and Drug Administration of the United States, 21 CFR 184, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/grasguid.html>>. Acesso em: 21 jun. 2010.

GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BODAS, R.; GONZÁLEZ, J.S. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 36-52, 2008.

OJEU. 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.

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

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

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição e caracterização química dos óleos essenciais

Compostos secundários são substâncias ausentes de função relacionada aos processos bioquímicos primários dos vegetais. Seus principais exemplos são os óleos essenciais, as saponinas e os taninos. A finalidade dos mesmos é promover proteção contra predadores (ex: insetos e animais herbívoros), microrganismos patogênicos e outros eventuais invasores. Também conferem odor e cor aos vegetais, atuando como mensageiros químicos entre a planta e o ambiente, de maneira a atrair insetos polinizadores e animais dispersores de sementes (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Óleos essenciais são substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis obtidas dos mais variados órgãos vegetais, em geral via extração a vapor ou por solventes. Seus compostos mais importantes são incluídos em dois grupos químicos: terpenóides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (Figura 1).

Figura 1 - Fórmula estrutural de alguns óleos essenciais já investigados no ambiente ruminal. A: monoterpenos; B: sesquiterpenos; C: fenilpropanóides. Adaptado de Calsamiglia et al. (2007)

Óleos essenciais não são propriamente “essenciais”, e recebem tal nome devido ao cheiro prazeroso que possuem (*quinta essentia* é o termo cunhado no século XVI por Paracelsus von Hohenheim para denominar o composto ativo de uma droga).

Terpenóides (terpenos contendo oxigênio como elemento adicional) formam um grupo variado de substâncias cuja estrutura básica deriva do isopreno (C_5H_8 ; Figura 2). São classificados de acordo com o número de isoprenos em seu esqueleto (CALSAMIGLIA et al., 2007). Monoterpenos possuem duas unidades C_5 , sesquiterpenos possuem três unidades e os diterpenos quatro. Os maiores terpenos são os hemiterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e os politerpenos $[(C_5)_n]$, sendo $n > 8$; TAIZ; ZIEGER, 2004].

Figura 2 - Unidade de isopreno. Adaptado de Taiz e Zieger (2004)

Várias são as funções químicas encontradas nos óleos essenciais, a exemplo da hidrocarboneto (apenas C e H), álcool ($C_{sat}-OH$), aldeído ($H-C=O$), cetona [$R-C(=O)-R'$], éster ($R-COOR'$), éter ($R-O-R'$) e fenol ($C_{aromático}-OH$; BAKKALI et al., 2008). Estima-se que 3000 tipos de óleos essenciais sejam conhecidos pela ciência, cerca de 300 deles com aplicações comerciais. Exemplos são a preservação e aromatização de alimentos, produção de perfumes, cosméticos e repelentes, produção de antimicrobianos e anti-inflamatórios (CALSAMIGLIA et al., 2007).

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 (Figura 1).

2.2 Mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais

Os possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais sobre uma célula bacteriana estão esquematizados na Figura 3. As ações estão em sua maioria associadas à membrana celular, como o transporte de elétrons e gradiente de íons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações enzimo-dependentes (ULTEE; KETS; SMID, 1999; DORMAN; DEANS, 2000).

Figura 3 - Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana. Adaptado de Burt (2004)

Os mecanismos que conferem aos óleos essenciais suas propriedades antimicrobianas ainda não são bem compreendidos (LAMBERT et al., 2001). Considerando a variada gama de substâncias químicas presentes nos óleos essenciais, é natural que a atividade antimicrobiana não seja mediada por um único mecanismo específico, havendo sinergia entre os modos de ação encontrados nos diversos compostos (CARSON; MEE; RILEY, 2002; BAKKALI et al., 2008). Como exemplo, a atividade antimicrobiana ruminal do óleo de alho é mais potente do que a atividade de seus componentes isolados (BUSQUET et al., 2005b). Da mesma forma, efeitos aditivos ou antagônicos são também possíveis de ocorrer (BURT, 2004).

Óleos essenciais são substâncias hidrofóbicas, o que lhes confere a capacidade de interagir com lipídios da membrana celular e das mitocôndrias das bactérias. Isto ocorre quando o óleo encontra-se sob forma indissociada (mais hidrofóbica), o que nas condições ruminais é favorecido pelo baixo pH (CALSAMIGLIA et al., 2007). A hidrofobicidade está diretamente relacionada à ação antimicrobiana. Mendoza, Wilkens e Urzua (1997) demonstraram que a inclusão de um grupamento metil reduziu drasticamente o potencial antimicrobiano do diterpenóide estudado, isto graças ao aumento da interação com a água propiciada pelo grupamento metil.

A interação óleo essencial/membrana celular altera a estrutura das mesmas, tornando-as mais fluidas e permeáveis (KNOBLOCH et al., 1986; SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995), o que permite o extravasamento de íons e outros conteúdos citoplasmáticos (LAMBERT et al., 2001; CARSON; MEE; RILEY, 2002). O carvacrol, um dos terpenos mais estudados no ambiente ruminal, é capaz de dissolver a dupla camada fosfolipídica da membrana celular, alinhando-se entre os ácidos graxos. Isto promove a formação de canais na membrana, já que os óleos essenciais são capazes de separar os ácidos graxos uns dos outros. Tais distorções na estrutura física da membrana causam expansão e desestabilização, aumentando a fluidez e a permeabilidade passiva (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002).

Extravasamento de íons é outro mecanismo. Observou-se que o óleo essencial de orégano (basicamente composto por carvacrol e timol) promoveu o extravasamento de íons fosfato (LAMBERT et al., 2001). Ultee, Kets e Smid (1999) verificaram que o carvacrol causou perda de íons potássio, devido ao aumento na concentração externa e diminuição na concentração interna desse íon. O mecanismo de atuação do carvacrol é apresentado na Figura 4, sendo semelhante ao dos ionóforos.

A célula bacteriana pode tolerar certa perda de íons do conteúdo celular sem comprometimento de sua viabilidade. Para tanto, há gasto de energia para acionar suas bombas iônicas. Entretanto, o extravasamento exagerado de íons e moléculas vitais pode levar a célula à morte. Mesmo não havendo morte direta, no ambiente ruminal, a perda de conteúdo citoplasmático e o gasto extra de energia fazem com que haja diminuição da população bacteriana em questão, já que essas perderiam viabilidade em um ambiente extremamente competitivo como o rúmen.

Figura 4 - Mecanismo de ação do carvacrol. 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 dissociado liga-se ao K^+ , retornando ao meio extracelular e carregando consigo este íon ou outro qualquer. No exterior, ocorre nova dissociação, com liberação do K^+ e recuperação de novo H^+ , fechando-se o ciclo. Adaptado de Ultee, Bennink e Moezelaar (2002)

A estrutura química é a responsável pelo modo de ação e atividade antimicrobiana de cada óleo essencial (DORMAN; DEANS, 2000). A presença do grupo hidroxila ($-OH$) nos compostos fenólicos é fundamental para a existência da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002). Todavia, a posição da hidroxila no anel fenólico parece ser menos importante, já que o timol e o carvacrol (Figura 1) apresentaram atividades semelhantes frente a variadas bactérias (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002). Contudo, já foram constatadas diferenças na ação do timol e carvacrol contra espécies gram-positivas e gram-negativas (DORMAN; DEANS, 2000).

A presença do radical metil ($-CH_3$) ou do acetato (CH_3COO^-), assim como o próprio anel fenólico *per se*, também afetam as propriedades antibacterianas de cada

óleo essencial (BURT, 2004). No ambiente ruminal, monoterpenos com as funções álcool e aldeído parecem ter maior efeito antimicrobiano, enquanto os monoterpenos hidrocarbonetos causam pequena inibição e, algumas vezes, inclusive estímulo à atividade microbiana (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008).

É de consenso na literatura que os óleos essenciais são mais efetivos contra bactérias gram-positivas do que gram-negativas (BURT, 2004), o que infere a possibilidade de efeitos ruminais semelhantes aos dos ionóforos. Nas bactérias gram-positivas, o óleo essencial pode interagir diretamente com a membrana celular. Em contrapartida, a parede celular externa que envolve a membrana das bactérias gram-negativas é hidrofílica, o que impede a entrada de substâncias hidrofóbicas (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998).

Mesmo assim, a membrana externa das gram-negativas confere apenas proteção parcial, pois não é totalmente impermeável a substâncias hidrofóbicas. Compostos de baixo peso molecular, a exemplo do carvacrol e timol, podem interagir com a água via pontes de hidrogênio. Assim, por meio da difusão, essas substâncias cruzam a parede externa através dos lipopolissacarídeos ou proteínas da membrana, chegando à dupla camada fosfolipídica da parede celular interna da bactéria gram-negativa (GRIFFIN et al., 1999). Este é um dos principais fatores que conferem ao carvacrol uma potente atividade antimicrobiana. A verificação dos efeitos de alguns óleos essenciais sobre bactérias gram-negativas constitui-se numa clara limitação, já que esta propriedade reduz a seletividade e aumenta a dificuldade de manipulação da fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Alguns outros mecanismos de ação também já foram verificados. Certas substâncias parecem atuar nas proteínas da membrana citoplasmática (KNOBLOCH et al., 1989). Em geral, os compostos fenólicos interagem com as proteínas por meio de pontes de hidrogênio e interações iônicas ou hidrofóbicas (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2004). Outro mecanismo existente é a redução da concentração interna de ATP sem aumento proporcional na concentração externa, o que transparece a ideia de menor síntese ou maior hidrólise do mesmo (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002).

Enzimas como as ATPases são conhecidas por localizarem-se na membrana citoplasmática, rodeadas por moléculas de lipídios. Dois possíveis mecanismos de ação

são sugeridos: a) hidrocarbonetos lipofílicos podem se acumular na dupla camada de lipídios da membrana celular, o que pode distorcer as interações entre proteínas e lipídios; b) é possível que óleos essenciais possam interagir diretamente com os sítios hidrofóbicos das proteínas da membrana (JUVEN et al., 1994).

Adicionalmente, crê-se que óleos essenciais atuem em enzimas envolvidas nos processos de regulação de energia e de síntese de componentes estruturais. Como exemplo, o óleo de canela (cinamaldeído ou 3-fenil-2-propenal) e seus componentes foram eficientes em inibir as enzimas aminoácido-descarboxilases de *Enterobacter aerogenes* (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995). Neste caso, substâncias fenólicas como o cinamaldeído não são capazes de desintegrar a membrana externa ou causar depleção de ATP. Imagina-se que o grupo funcional carbonil ($R^1\text{-CO-R}^2$) seja o responsável por se ligar às proteínas, inibindo a ação das aminoácido-descarboxilases (WENDAKOON; SAKAGUCHI, 1995). Também já se demonstrou que o eugenol [2-metoxi-4-(2-propenil)fenol] inibiu a produção de amilases e proteases por *Bacillus cereus* (THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989).

Por fim, substâncias ativas presentes no óleo de alho podem inibir a síntese de RNA, DNA e proteínas celulares (FELDBERG et al., 1988). O óleo de alho reduz a produção de metano (CH_4) ruminal *in vitro* (BUSQUET et al., 2005a, 2005b). Sugere-se que o efeito ocorra via ação direta sobre a metanogênese, diminuindo as populações de *Archaea* por inibição da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA). Compostos organossulfurados encontrados no óleo de alho são capazes de inibir esta enzima, essencial para a síntese das unidades isoprenóides formadoras da membrana lipídica das *Archaea*.

2.3 Utilização de óleos essenciais na nutrição de ruminantes

Há cerca de 50 anos, Crane, Nelson e Brown (1957) foram provavelmente os primeiros a demonstrar os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal, verificando que limoneno e pineno eram capazes de inibir a formação de CH_4 . Oito anos depois, foi constatado que o timol inibia a deaminação ruminal, fato observado pelo acúmulo de aminoácidos juntamente com redução na concentração de NH_3

(BORCHERS, 1965). Em seguida, alguns poucos estudos *in vitro* foram conduzidos, basicamente motivados pela observação de que certas plantas contendo óleos essenciais eram menos consumidas por animais mantidos em pastagem e, concomitantemente, causavam redução na digestibilidade (OH et al., 1967; NAGY; TENDERGY, 1968).

Em contrapartida, o início da utilização de ionóforos, em meados dos anos 70, naturalmente desestimulou esta incipiente linha de investigação. Somente em 2003, com o anúncio europeu da proibição dos antibióticos como promotores de crescimento, é que se resgatou o interesse pelo uso dessas substâncias na produção animal, não somente em ruminantes como também em suínos, aves e peixes.

2.3.1 Perfil de ácidos graxos de cadeia curta e pH ruminal

Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Um dos principais objetivos das pesquisas com óleos essenciais é a identificação de substâncias capazes de mimetizar os efeitos dos ionóforos sobre a produção de AGCC, como o estímulo à produção de propionato sem alteração na concentração total de AGCC.

Óleos essenciais são capazes de manipular a fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008) e geram alterações nas populações microbianas do rúmen, como confirmado em experimento de biologia molecular (FERME et al., 2004). Trabalhos de triagem como os de Busquet et al. (2006), Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006) e Castillejos et al. (2007) claramente demonstraram que alguns óleos essenciais foram efetivos em alterar a fermentação ruminal *in vitro*, enquanto outros não apresentaram efeito. Estudos *in vitro* mostram, em sua maioria, redução ou ausência de efeito dos óleos essenciais sobre a concentração total de AGCC. Da mesma forma, são claros os efeitos dose-dependentes, já que elevadas inclusões normalmente inibem a fermentação ruminal *in vitro* evidenciada pela queda na concentração de AGCC ou na degradação de substrato.

À primeira vista, observar inibição de fermentação é, sem dúvida, nutricionalmente indesejável. Contudo, o desafio está justamente em encontrar doses capazes de manipular positivamente a fermentação ruminal com pouco ou nenhum

efeito inibitório sobre a fermentação total. No mais, pesquisas *in vitro* sempre apresentam limitações. É importante destacar que, mesmo para a monensina, é comum observar reduções na degradação *in vitro* da MO e na concentração total de AGCC em função da dose utilizada (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; RUSSELL; STROBEL, 1989).

Mesmo sendo possível, são poucas as pesquisas que mostraram aumento na concentração total de AGCC. Castillejos et al. (2005) verificaram que 1,5 mg/L de uma mistura de óleos essenciais aumentou a concentração total de AGCC em sistema *in vitro* de fluxo contínuo, embora sem efeitos sobre a digestibilidade da matéria orgânica (MO). Em geral, resultados de aumento na concentração *in vitro* de AGCC devem ser sempre vistos com cautela, já que podem estar relacionados à própria degradação dos óleos essenciais. Contudo, resultados controversos também foram obtidos por Benchaar et al. (2007), em que vacas lactantes recebendo 750 mg/d de mistura de óleos essenciais apresentaram tendência de aumento na concentração de AGCC quando alimentadas com silagem de alfafa, mas redução quando alimentadas com silagem de milho.

A ausência de efeitos sobre a concentração total de AGCC pode ser vista de forma positiva, desde que acompanhada por alterações na proporção molar dos AGCC (menor relação acetato:propionato; $C_2:C_3$) ou por decréscimos na produção de CH_4 e na concentração de NH_3 . Vários estudos demonstraram que óleos essenciais podem apresentar efeitos semelhantes aos ionóforos. Bons exemplos são o uso *in vitro* ou *in vivo* de ciclodextrinas de raiz-forte (MOHAMMED et al., 2004), cinamaldeído ou óleo de alho em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a) e salicilato de benzila ou óleo de alho em *in vitro batch culture* (BUSQUET et al., 2006).

Estudos *in vivo* evidenciaram que o óleo de anis apresentou efeitos sobre as concentrações de AGCC semelhantes à monensina (FANDIÑO et al., 2008), enquanto o óleo de zimbro e o cinamaldeído promoveram aumento numérico na concentração de propionato e queda numérica na relação $C_2:C_3$ (CHAVES et al., 2008b). Da mesma forma, uma mistura comercial de extrato de plantas (Biostar[®]) apresentou aumento na concentração de propionato com queda na relação $C_2:C_3$, também com resultados semelhantes à monensina (DEVANT; ANGLADA; BACH, 2007). Para saber mais sobre

o efeito dos óleos essenciais na fermentação ruminal e produção de AGCC, ótimas revisões são as de Calsamiglia et al. (2007), Benchaar et al. (2008) e Hart et al. (2008).

pH ruminal. Aparentemente, os óleos essenciais não alteram o pH ruminal (NEWBOLD et al., 2004; CASTILLEJOS et al., 2007). Quando constatado aumento do pH *in vitro*, este pode ser atribuído à concomitante redução na concentração total de AGCC, demonstrando inibição da fermentação ruminal por doses exageradas (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006).

O efeito dos óleos essenciais pode ser modulado pelo pH do meio. Rações ricas em concentrado, mais propensas ao baixo pH ruminal, são passíveis de potencializar os efeitos dos óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007). Isto ocorre, pois os óleos necessitam estar na forma indissociada para interagir com os lipídios da membrana celular (Figura 4), fato que é propiciado pela maior acidez do meio. Como exemplo, o óleo de canela e seu principal componente, o cinamaldeído, aumentaram a relação $C_2:C_3$ em meio de incubação com pH 7,0. Porém, em incubação com meio a pH 5,5 verificou-se redução na relação $C_2:C_3$ (CARDOZO et al., 2005). Da mesma forma, Spanghero et al. (2008) verificaram alteração nos efeitos de uma mistura de óleos essenciais em função do pH do meio de incubação (7,0 vs 5,5), com efeitos mais pronunciados em pH ácido.

Em geral, estudos *in vivo* não apresentaram efeito de óleos essenciais no pH ruminal ao se fornecer dieta de alto concentrado (FANDIÑO et al., 2008; CHAVES et al., 2008b; YANG et al., 2010a; 2010b) ou dieta para vacas leiteiras (BENCHAAR; McALLISTER; CHOUINARD, 2008). Por outro lado, foi observada queda no pH ao se fornecer dieta de alto concentrado (DEVANT et al., 2007; CHAVES et al., 2008a) ou aumento utilizando dietas para vacas em lactação (BENCHAAR et al., 2006).

2.3.2 Metanogênese

Problemas relacionados ao efeito estufa e ao aquecimento global pressionam a agricultura a ser cada vez mais eficiente e menos danosa ao ambiente. No Brasil, a fermentação entérica dos animais de criação (basicamente CH_4 produzido pela fermentação ruminal) é responsável por 12% das emissões antrópicas de CO_2 -eq

(CERRI et al., 2009). Uma vaca gera grande quantidade de CH₄, podendo chegar a 500 L ou 357 g/dia (NEWBOLD; RODE, 2006). Pesquisadores brasileiros quantificaram a emissão de CH₄ por vacas como sendo entre 278 a 403 g/d (PRIMAVESI et al., 2004).

Ao considerarmos o Estado de São Paulo, onde o desmatamento é nulo e a industrialização só tende a crescer, é de se imaginar que as reduções nas emissões antrópicas de gases de efeito estufa recairão em grande parte sobre o setor agropecuário. A Política Estadual de Mudanças Climáticas do Estado determinou que as emissões de 2020 deverão ser 20% menores do que as registradas em 2005.

É amplamente conhecido o conceito de que a produção de CH₄ gera perdas energéticas ao animal, variando entre 2 a 12% da energia bruta total consumida (VAN SOEST, 1994). Em contrapartida, a geração de CH₄ pelas *Archaea* é vital ao equilíbrio ruminal. O rúmen é ambiente extremamente redutor (potencial redox entre -250 e -450 mV) e, por esse motivo, produzir CH₄ é a principal via de remoção de hidrogênio (H⁺). Caso haja acúmulo de H⁺, há alta inibição dos sistemas enzimáticos microbianos, principalmente os que envolvem a regeneração de nicotinamida adenina dinucleotídeo ($\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2$; RUSSELL, 2002).

Sob certas condições, alguns óleos essenciais possuem capacidade, à semelhança dos ionóforos, de atuar seletivamente sobre as populações microbianas do rúmen (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008). Alterar o padrão fermentativo, reduzindo a relação C₂:C₃, torna o rúmen energeticamente mais eficiente e reduz a geração de CH₄. Ao se produzir propionato não há produção de H⁺ como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato. Além disso, as vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H⁺ (VAN SOEST, 1994; RUSSELL, 2002). Logo, maximizar a produção de propionato é competir com as metanogênicas por substrato.

Observou-se *in vitro* que o óleo de alho e o di-alil-di-sulfeto (300 mg/L) reduziram a produção de CH₄ em 74% e 69%, respectivamente, efeito inclusive mais pronunciado do que o observado para a monensina (42% de redução; BUSQUET et al., 2005b). O mesmo grupo de pesquisadores verificou que estas substâncias aumentaram a proporção de propionato e reduziram a de acetato (BUSQUET et al., 2005a, 2005b).

Além do efeito indireto na redução de CH₄ pelo aumento de propionato, sugere-se que o óleo de alho possui efeito direto sobre as metanogênicas, mediada pela ação de seus compostos organossulfurados sobre a enzima HMG-CoA (ver seção 2.2; BUSQUET et al., 2005a, 2005b). Em estudo *in vitro* de mais longa duração, a adição de 20 µg/mL de alicina reduziu a produção de CH₄ sem efeitos sobre o padrão de AGCC e a concentração de NH₃ (McALLISTER; NEWBOLD, 2008). Por análises por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real, estes autores observaram diminuição do DNA metanogênico sem alteração na quantidade de DNA bacteriano total.

Também com técnicas moleculares, confirmou-se que outros óleos essenciais (cinamaldeído, óleo de zimbro, além do óleo de alho) alteraram a diversidade dos microrganismos metanogênicos ruminais, todavia sem efeitos sobre a quantidade total de DNA metanogênico (OHENE-ADJEI et al., 2008).

Protozoários são colonizados em sua superfície por bactérias exo e endossimbiontes, sendo expressiva a quantidade de *Archaea* metanogênicas (RUSSELL, 2002). Estudos demonstraram que 9 a 25% do total de metanogênicas encontradas no rúmen estão associadas aos protozoários (NEWBOLD; LASSALAS; JOUANY, 1995). Sugere-se que, quando existentes, os efeitos dos óleos essenciais na redução de CH₄ estejam parcialmente associados à defaunação.

Os extratos metanólicos e etanólicos de funcho (*Foeniculum vulgare*), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) e alho (*Allium sativum*) inibiram a produção *in vitro* de CH₄, com efeitos variados sobre a degradação (KAMRA; AGARWAL; CHAUDHARY, 2006). Dentre os materiais testados, o extrato metanólico de alho apresentou o melhor resultado, com 64% de redução na produção de CH₄, sem afetar a atividade das enzimas fibrolíticas e a degradabilidade da matéria seca (MS).

O conhecimento dos efeitos dos óleos essenciais sobre a metanogênese é muito carente de experimentos *in vivo*, principalmente os de longa duração. Os resultados existentes são bastante variados, com alguns trabalhos mostrando resultados promissores. O óleo encapsulado de raiz-forte (20 g/kg de MS consumida) apresentou 19% de redução de CH₄ em novilhos, sem efeitos sobre a população de protozoários ou a digestibilidade ruminal (MOHAMMED et al., 2004). Efeitos mais prolongados foram observados quando 250 mg/d de mistura de óleos de orégano reduziram em 12% o CH₄

produzido por ovinos no decorrer de 15 dias (WANG; WANG; ZHOU, 2009). Da mesma forma, 2 g/kg de MS consumida de di-alil-di-sulfeto reduziram em 11% a emissão de CH₄ em ovinos, com efeitos que perduraram por 23 dias (KLEVENHUSEN et al., 2010).

Folhas de orégano moídas (500 g/d) diminuíram em 40% a produção de CH₄ em vacas leiteiras, com aumento na eficiência alimentar e produção de leite corrigida para gordura (HRISTOV et al., 2010). Trabalho nacional demonstrou que 10 mL de óleo de eucalipto reduziram em 31% a emissão de CH₄ em ovinos, novamente sem efeitos negativos sobre a digestibilidade (SALLAM et al., 2009).

Por outro lado, há trabalhos com ausência de efeito, como ao usar 1 g/d de mistura comercial de óleos essenciais (Crina[®] Ruminants; timol, limoneno e guaiacol) para bovinos de corte (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2006). Em outro estudo, o óleo de alho (5 g/d) e de zimbro (*Juniperus communis*; 2 g/d) também não foram capazes de reduzir a produção de CH₄ de vacas em lactação (MEALE et al., 2010).

Por fim, mesmo com todas as preocupações ambientais, políticas e econômicas que tendem a se agravar com a iminência das mudanças climáticas, é compreensível que pecuaristas somente aceitem utilizar aditivos mitigadores de CH₄ caso haja benefícios diretos ou indiretos ao sistema de produção. Assim, torna-se claro que pesquisas visando reduzir a agressão ao meio ambiente e as consequências do câmbio climático devem sempre estar aliadas àquelas que gerem maior eficiência produtiva.

2.3.3 Metabolismo protéico e população de protozoários

Metabolismo protéico. Dentre os principais efeitos dos óleos essenciais está a diminuição da degradação protéica ruminal. Dados existentes levam a crer que alguns óleos reduzem a taxa de deaminação e a adesão e colonização das bactérias proteolíticas aos seus substratos (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008).

Ruminantes possuem baixa eficiência de utilização de N. Assim, alterar o metabolismo ruminal do N é ótima forma de reduzir o custo de alimentação desses animais, de maneira a melhorar o desempenho animal e reduzir a poluição ambiental causada pela ureia/NH₃ (CALSAMIGLIA et al., 2010).

Já foi observado que óleos essenciais diminuíram a diversidade e a quantidade de bactérias hiperprodutoras de NH_3 , o que resultou em menor taxa de produção de NH_3 a partir de aminoácidos (McINTOSH et al.; 2003; WALLACE, 2004). Reduzir o número dessas bactérias é muito interessante, pois tais microrganismos, apesar de existirem em baixas concentrações, possuem elevadíssima atividade produtora de NH_3 (RUSSELL, 2002). Logo, a diminuição desta população promoveria substancial redução na produção de NH_3 , com pouco ou nenhum efeito sobre a produção total de proteína microbiana e sobre os processos de degradação ruminal. Todavia, há variação na sensibilidade das hiperprodutoras de NH_3 aos óleos essenciais. Algumas dessas bactérias (*Clostridium sticklandii* e *Peptostreptococcus anaerobius*) foram sensíveis à ação dos mesmos, enquanto outras (*Clostridium aminophilum*) não foram afetadas (McINTOSH et al., 2003). De maneira geral, os trabalhos de McIntosh et al. (2003), Newbold et al. (2004) e Wallace (2004) sugerem que os efeitos dos óleos essenciais sobre o metabolismo protéico são mediados pela redução da deaminação, efeito este atribuído à inibição das bactérias hiperprodutoras de NH_3 .

Resultados relacionados à diminuição da degradação *in situ* da proteína (MOLERO et al., 2004) indicam que outras ações, além de menor deaminação, podem também ocorrer. Óleos essenciais podem inibir a proteólise ou estimular a peptidólise, já que foi comprovada diminuição de 18% na concentração de peptídeos de cadeia longa devido à adição de 5 mg/L de uma mistura de óleos essenciais (CASTILLEJOS et al., 2007).

Em contrapartida, vários estudos não verificaram influência dos óleos essenciais sobre o metabolismo protéico ruminal, seja em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (CASTILLEJOS et al., 2005, 2007) ou *in vivo* usando vacas em lactação (BENCHAAAR et al., 2006, 2007). Estas ausências de resultado são atribuídas principalmente à dificuldade de se atingir *in vivo* as doses efetivas determinadas *in vitro*. Além disso, soma-se a questão relacionada à adaptação microbiana ao longo do tempo (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008).

População de protozoários. Protozoários ocupam papel de destaque nos processos fermentativos ruminais (HUNGATE, 1966), mas a verdade é que os mesmos não são essenciais à fermentação ruminal.

Ainda que a defaunação cause outras alterações ruminais como a menor degradação de lactato, maior propensão à acidose e aumento de sensibilidade à toxidez por cobre, cientistas reconhecem que os efeitos da eliminação de protozoários sobre o fluxo duodenal de N e sobre a digestão da fibra são os mais relevantes (FONSECA; DIAS-DA-SILVA, 2001). Protozoários são responsáveis pela alta reciclagem intrarruminal de proteína microbiana. Entre 60 e 80% da biomassa de protozoários não deixam o rúmen, ficando ali retidos devido ao processo de lise (FONSECA; DIAS-DA-SILVA, 2001). Isto aumenta a retenção ruminal de proteína microbiana, promovendo o acúmulo de NH_3 (RUSSELL, 2002). Compilações de resultados (JOUANY; DEMEYER; GRAIN, 1988) e trabalho de meta-análise (EUGÈNE; ARCHIMÈDE; SAUVANT, 2004) mostraram que a defaunação promove maior escape ruminal de proteína, menor concentração de NH_3 e aumento de desempenho animal.

Contudo, são inexistentes técnicas de defaunação que sejam práticas e economicamente viáveis. O uso de compostos secundários de vegetais surge como opção. A esperança depositada é que tais substâncias não promovam completa defaunação ruminal, mas sim redução parcial até níveis em que haja vantagens sobre o metabolismo do N sem danos à fermentação.

O óleo de anis, fornecido para novilhas recebendo 90% de concentrado na MS da dieta, diminuiu a população de protozoários, com menor concentração de NH_3 ruminal e queda na relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ (CARDOZO et al., 2006; FANDIÑO et al., 2008). Resultados semelhantes também foram observados ao se fornecer hortelã-pimenta seca (200 g/d) para novilhos holandeses (ANDO et al., 2003). Por outro lado, redução no número de protozoários não foi verificado em vacas em lactação recebendo mistura de óleos essenciais (BENCHAAAR et al., 2006, 2007), em novilhos alimentados óleo de raiz-forte (MOHAMMED et al., 2004) ou em novilhas recebendo até 1600 mg/d de eugenol (YANG et al., 2010b).

2.3.4 Desempenho animal

Informações sobre o desempenho de ruminantes recebendo óleos essenciais ainda são escassas na literatura, em parte devido às pesquisas terem se iniciado

apenas nesta década. Parte dos resultados negativos encontrados em trabalhos *in vivo* pode ser atribuída ao desconhecimento das melhores doses, da forma adequada de fornecimento e das interações com a dieta e com o ambiente ruminal (ex: tipo de substrato, pH, taxa de passagem, populações microbianas, etc).

É importante considerarmos que óleos essenciais e extratos de plantas não são substâncias padronizadas e, por isso, apresentam grande variação na concentração e nos tipos de substâncias ativas. Logo, é coerente que resultados *in vivo* sejam contraditórios e inconsistentes, mesmo para aquelas substâncias cujos efeitos positivos já foram comprovados *in vitro*.

De maneira geral, experimentos *in vivo* são conduzidos com produtos comerciais que possuem em sua fórmula diversos óleos essenciais, visando tirar proveito dos benefícios individuais de cada substância.

Consumo de matéria seca. Plantas nativas do deserto norte-americano ricas em óleos essenciais apresentam certo grau de proteção contra o herbivorismo. Uma gama de compostos voláteis já foi relacionada ao consumo dessas plantas, a exemplo da cânfora, limoneno, α -pineno, β -cariofileno, *p*-cimeno, α -humuleno e outros (ESTELL et al., 1998, 2000). Em estudos com compostos isolados, o canfeno e o cariofileno misturados a *pellets* de alfafa apresentaram 16 e 14% de redução no consumo de matéria seca (CMS), respectivamente (ESTELL et al., 2002).

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

Estes resultados indicam que óleos essenciais podem causar problemas de palatabilidade, o que dependerá da dose necessária para se conseguir o efeito ruminal desejado. Óleos essenciais possuem, em sua grande maioria, odor e sabor bastante acentuados. Efeitos dose-dependentes foram claramente demonstrados ao se fornecer 0, 400, 800 e 1600 mg/d de cinamaldeído para novilhas, constatando-se efeito quadrático sobre o CMS (YANG et al., 2010a). Logo, uma alternativa talvez seja a encapsulação. Para responder a essa pergunta, Cardozo et al. (2006) encapsularam

cinamaldeído (600 mg/d) + eugenol (300 mg/d) e não constataram queda no CMS, concluindo-se que a encapsulação foi eficiente.

A interferência no CMS está relacionada ao tipo de óleo, pois ausência de efeito ou estímulo ao consumo também podem ocorrer. O óleo de anis e de pimenta aumentaram em 5% e 9% o CMS de novilhas, respectivamente (CARDOZO et al., 2006). Curiosamente, o óleo de pimenta aumentou em 26% o consumo de água. Em outro trabalho, o óleo de pimenta aumentou em 11% o CMS (FANDIÑO et al., 2008). Por fim, baixa dose de cinamaldeído (400 mg/d) maximizou o CMS de novilhos recém chegados em confinamento (YANG et al., 2010c), enquanto que 1600 mg/d de eugenol não alterou o consumo de novilhas (YANG et al., 2010b).

Produção de leite. Os resultados de Benchaar et al. (2006, 2007) não mostraram efeito de 750 mg ou 2 g/d de produto comercial à base de óleos essenciais (Crina[®] Ruminants; timol, limoneno e guaiacol) sobre o CMS e a produção e composição do leite de vacas holandesas. Da mesma forma, hortelã-pimenta (20 g/kg MS; HOSODA et al., 2005) e uma mistura de monoterpenos (linalol, *p*-cimemo, α -pineno e β -pineno; 0,43 g/kg MS de consumida; MALECKY; BROUDISCOU; SCHMIDELY, 2009) também não afetaram a produção e composição do leite. Todavia, nestes quatro trabalhos não se constatou efeito no CMS e em variáveis relacionadas à fermentação ruminal, demonstrando que os tratamentos foram provavelmente inativos. Resultados desanimadores também foram obtidos ao se fornecer até 0,96 g/d de mistura comercial de óleos essenciais (RumaXol Feed; SPANGUERO et al., 2009) ou 1 g/d de cinamaldeído (BENCHAAAR; McALLISTER; CHOUINARD, 2008), não havendo efeitos sobre CMS, produção e composição de leite, além da digestibilidade dos nutrientes.

Resultados positivos sobre a produção de leite já foram observados. Tassoul e Shaver (2009) constataram que 1 g/d de mistura de óleos essenciais (Crina[®] Ruminants) reduziu em 7% o CMS, com ausência de efeito sobre a produção de leite. Consequentemente, a eficiência de produção de leite aumentou em 8% (tendência de efeito significativo). Usando 1,2 g/d do mesmo produto comercial, Kung Jr. et al. (2008) verificaram 7% de aumento no CMS, 8% de aumento na produção de leite corrigida para gordura e ausência de efeito sobre a eficiência alimentar. Com 170 vacas em

lactação, observou-se 1,6 kg/d a mais na produção de leite ao se utilizar 1,2 g/d de Crina[®] Ruminants (VARGA et al., 2004). Por fim, 1 g/d de mistura comercial de óleos essenciais (Agolin Ruminant[®]; eugenol, acetato de geranil e óleo de coentro) promoveu maior concentração e produção de gordura no leite, sem influência no CMS e na produção de leite (SANTOS et al., 2010).

Composição e qualidade do leite. Dentre as preocupações do fornecimento de óleos essenciais para vacas em lactação está a possível presença de cheiro e gosto no leite. Monoterpenos (ex: α -pineno, β -pineno, β -mirceno, sabineno, δ -3-careno, limoneno e outros) são naturalmente encontrados no leite de vacas em pastagens nativas dos alpes italianos (NONI; BATTELLI, 2008; CHION et al., 2010) e franceses (TORNAMBÉ et al., 2006). Em geral, α -pineno e β -pineno são os terpenos mais comuns no leite de regiões europeias (KALAC, 2010). Esta é, inclusive, uma das explicações para as peculiaridades organolépticas dos queijos finos dessas regiões.

Óleos essenciais podem fornecer odor e sabor, mas o mais importante é que alteram os microrganismos existentes no leite, influenciando no processo de produção de queijo. Portanto, ainda que existente, é pequena a chance de comprometimento da qualidade do leite. No mais, já se demonstrou aumento na atividade antioxidante do leite pelo uso de hortelã-pimenta em vacas em lactação (UEGAKI et al., 2001). Pesquisadores consideram que este seja outro uso a ser explorado com óleos essenciais.

Alguns terpenos, a exemplo do neral, geranial e citronelal (presentes nos óleos de *Cymbopogon* sp.) apresentam a função aldeído. Discute-se que aldeídos (etanal, propanal, pentanal, hexanal, etc) podem ser passados do alimento para a carne e o leite, alterando as propriedades organolépticas dos mesmos e, além disso, podendo ser danosos à saúde animal (CHMELOVÁ et al., 2009; KALAC, 2010). Entretanto, ainda não se sabe quais seriam os impactos dos óleos essenciais em relação a esta questão.

Estudam-se também as aplicações na manipulação do perfil de ácidos graxos do leite. Tais pesquisas se fundamentam na ideia de que óleos essenciais podem inibir a biohidrogenação ruminal via redução do número ou da atividade metabólica das bactérias envolvidas neste processo (WOOD et al., 2010).

Em estudos com sistema *in vitro* de fluxo contínuo, provou-se que o cinamaldeído, mas não o eugenol, foi capaz de alterar os processos de biohidrogenação ruminal (LOURENÇO et al., 2008). Pesquisadores australianos triaram *in vitro* 91 plantas nativas daquele país quanto às propriedades moduladoras da biohidrogenação. Duas plantas (*Acacia iteaphylla* e *Kennedia eximia*) apresentaram efeitos positivos, inibindo a saturação do ácido linoléico e promovendo acúmulo de ácido linoléico conjugado e ácido vacênico (DURMIC et al., 2008).

Por outro lado, trabalhos *in vivo* não confirmaram esta propriedade. Vacas em lactação recebendo 750 mg (BENCHAAAR et al., 2007) ou 2 g/d (BENCHAAAR et al., 2006) de mistura de óleos essenciais (Crina Ruminants®) não apresentaram efeito sobre o perfil de ácidos graxos do leite. O cinamaldeído (1 g/d) também não alterou o perfil de gordura do leite (BENCHAAAR; CHOUINARD, 2009), enquanto Malecky, Broudiscou e Schmidely (2009) também não observaram efeito de mistura de monoterpenos no leite caprino.

Ganho de peso e qualidade da carne. O fornecimento de mistura comercial de óleos essenciais (Crina® Ruminants) não trouxe vantagens sobre o desempenho animal. Neste trabalho, o CMS e o ganho médio diário (GMD) de novilhas em crescimento foram 7,46 kg/dia e 0,73 kg para o grupo controle e 7,28 kg/dia e 0,68 kg para o grupo recebendo óleo essencial, respectivamente (BEAUCHEMIN; MCGINN, 2006). O uso de até 1600 mg/d de cinamaldeído não alterou o GMD de novilhos confinados, porém o uso de 200 mg/d apresentou GMD numericamente superior ao controle e à monensina (1,97; 2,01 e 2,18 kg para controle, monensina e cinamaldeído; YANG et al., 2010c).

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

Novilhos alimentados com outra mistura de óleos essenciais (Vertan®; timol, eugenol, vanilina e limoneno) apresentaram eficiência alimentar de 0,145; 0,158; 0,154 e 0,130 para o controle, monensina e 2 ou 4 g/dia do produto, respectivamente (BENCHAAAR; DUYNISVELD; CHARMLEY, 2006). Foi verificado efeito quadrático de

óleo sobre a eficiência alimentar, sendo 2 g/d a melhor dose. Logo, a dose mais elevada do produto foi prejudicial ao desempenho.

O potencial dos óleos essenciais também foi demonstrado ao ser usado produto comercial contendo extratos de cinarina, ginseng e feno-grego (Biostar[®]). Nesta pesquisa, bovinos confinados recebendo esta mistura apresentaram valores de peso vivo final e GMD intermediários entre o tratamento controle e monensina (DEVANT; ANGLADA; BACH, 2007).

Em relação a cordeiros confinados, o carvacrol ou cinamaldeído (200 mg/kg MS) não alteraram o CMS, o GMD e os rendimentos de carcaça e cortes. Mesmo assim, o GMD foi numericamente superior para cinamaldeído (312 g), seguido por carvacrol (309 g) e pelo grupo controle (288 g). Questão interessante foi que a avaliação sensorial das carnes não diferiu entre os tratamentos (CHAVES et al., 2008a), ajudando a desmitificar a ideia que óleos essenciais podem alterar o sabor e a qualidade da carne.

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

2.3.5 Limitações práticas ao uso de óleos essenciais

Degradação ruminal. Microrganismos ruminais expostos continuamente a compostos secundários são capazes de desenvolver a habilidade de degradá-los (VILLALBA; PROVENZA, 2010). Óleos essenciais de *Thuja orientalis*, planta eventualmente tóxica, foram parcialmente degradados por microrganismos ruminais em sistema RUSITEC (CHIZZOLA; HOCHSTEINER; HAJEK, 2004).

Durante a fermentação ruminal *in vitro*, vários monoterpenos foram extensivamente degradados após 3 h de incubação, com indícios de degradação mais extensa ao se utilizar inóculo de animais adaptados à dieta fibrosa. Segundo os autores, ao se eliminar as bactérias gram-positivas, não foram observadas alterações nas taxas de degradação dos monoterpenos, sendo provável que a degradação seja basicamente promovida por bactérias fibrolíticas gram-negativas (MALECKY; BROUDISCOU, 2009).

Em experimentos *in vivo*, o fluxo duodenal de monoterpenos (linalol, *p*-cimemo, α -pineno e β -pineno) foi drasticamente reduzido em relação ao fluxo ruminal. A extensão de degradação foi dependente do tipo de terpeno, o que alterou a proporção relativa dos monoterpenos originalmente fornecida aos animais (MALECKY; BROUDISCOU; SCHMIDELY, 2009). Experimentos *in vitro* também comprovam que a degradação de terpenos ocorre a taxas diferentes para cada composto. Alguns monoterpenos (mirceno, β -ocimeno, α -pineno e sabineno) e um sesquiterpeno (α -copaeno) foram extensivamente degradados, enquanto timol e canfeno foram pouco consumidos (BROUDISCOU; CORNU; ROUZEAU, 2007). Portanto, tudo indica que microrganismos ruminais são capazes de degradar parcialmente os óleos essenciais, e a taxas que variam de acordo com cada composto.

Adaptação ruminal. Pesquisas sugerem que os efeitos dos óleos essenciais sobre a fermentação ruminal podem desaparecer ao longo do tempo (CARDOZO et al., 2004). Em sistema *in vitro* de fluxo contínuo, os óleos de canela, alho e anis (7,5 mg/kg MS ou 0,22 mg/L) foram capazes de alterar o perfil de AGCC durante os seis primeiros dias de incubação, porém com ausência de efeito após esse período (CARDOZO et al., 2004). Da mesma forma, o óleo de alho (300 mg/L) alterou a fermentação ruminal *in vitro* em incubações de 24 h (BUSQUET et al., 2005b), mas doses semelhantes à anterior (312 mg/L) não apresentaram efeito em experimento de maior duração em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a).

Para dar mais suporte à ideia, verificou-se que o citronelal inibiu a atividade fermentativa de inóculo ruminal obtido de ovinos e veados que não eram alimentados com uma planta rica em citronelal. Todavia, efeitos não foram observados quando o inóculo utilizado foi obtido de veado adaptado a esta planta (OH et al., 1967).

Assim, é de consenso entre pesquisadores que as populações microbianas ruminais são passíveis de adaptação. É plausível assumir que parte dessa adaptação seja em razão das populações resistentes tomarem o nicho ecológico anteriormente ocupado pelas populações sensíveis. Contudo, como aqui exposto, microrganismos ruminais podem desenvolver a capacidade de degradar óleos essenciais (VILLALBA; PROVENZA, 2010). Estas características, sem dúvida alguma, dificultam o uso comercial de produtos à base de óleos essenciais. Pesquisas cujo objetivo seja estudar a adaptação microbiana do rúmen aos óleos essenciais são raras na literatura internacional.

Volatilização e absorção ruminal. Óleos essenciais podem ser parcialmente perdidos para a fase gasosa do rúmen, sendo expelidos pela eructação. Por serem substâncias voláteis, já foram verificadas perdas gasosas durante avaliações de biodegradação de óleos essenciais (MISRA et al., 1996; MARÓSTICA JR.; PASTORE, 2007). Malecky e Broudiscou (2009) discutiram que parte do desaparecimento de monoterpenos durante incubação ruminal *in vitro* possa ter como causa a volatilização. Adicionalmente, terpenos podem cruzar a parede ruminal e, assim, serem absorvidos pela corrente sanguínea (MALECKY; BROUDISCOU; SCHMIDELY, 2009; ESTELL; UTSUMI; CIBILS, 2010). Campbell et al. (2010) demonstraram absorção ruminal da cânfora, inclusive apresentando variação animal quanto à capacidade desintoxicante do organismo. De maneira a comprovar a absorção, vários monoterpenos e sesquiterpenos já foram identificados na gordura do tecido adiposo de cordeiros (PRIOLO et al., 2004) e no leite (KALAC, 2010).

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

Mesmo assim, tudo leva a crer que as doses determinadas *in vitro* são superiores às necessárias *in vivo*. A concentração de bactérias é muito menor *in vitro* do que em condições naturais. A ação de um composto é função de sua capacidade de

interagir com as bactérias. Logo, quanto menor a população de microrganismos, maior a dose necessária para a existência de efeito (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Por outro lado, é certo que a degradação dos compostos no rúmen, a adaptação microbiana, a taxa de passagem para o duodeno, a volatilização e absorção pela parede ruminal são responsáveis por parcela considerável das divergências entre ensaios *in vitro* e *in vivo* (VILLALBA; PROVENZA, 2010). De modo geral, a fim de se atingir os efeitos fisiológicos almejados, todos estes fatores se traduzem na necessidade de doses mais elevadas. A transferência dos conhecimentos *in vitro* para *in vivo* é, realmente, tarefa bastante complexa e desafiadora, não apenas de ordem técnica, mas também econômica.

Efeitos adversos. Mesmo consideradas substâncias GRAS (*generally recognized as safe*), óleos essenciais são também conhecidos por seus efeitos fototóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, sendo também encontrada ação anti-carcinogênica (TISSERAND, 1997; BAKKALI et al., 2008).

Alguns compostos encontrados nos óleos essenciais podem afetar os sistemas nervoso e reprodutor (ex: abortivo para coelhos, cobaias e humano). Todavia, as doses necessárias são, em geral, bastante elevadas (TISSERAND, 1996a, 1996b), as quais ultrapassam, e muito, as comumente empregadas na nutrição de ruminantes.

Estudos que abordem tais efeitos em animais de criação, além dos impactos na alimentação humana, são pouco frequentes. O único indicativo foi que o cinamaldeído, óleo de alho e óleo de zimbro causaram maior peso do fígado de cordeiros confinados, com pouca alteração no perfil de ácidos graxos do mesmo (CHAVES et al., 2008b). Em outro trabalho, o uso de carvacrol ou cinamaldeído casou tendência de aumento no peso do fígado (CHAVES et al., 2008a). Embora seja coerente imaginar que esse aumento no fígado seja causado pela metabolização dos compostos secundários e seus derivados, é por outro lado bastante prematuro especular que seja indicativo de sinais relacionados à intoxicação.

Óleos essenciais podem sair nas fezes, passando diretamente pelo trato gastrointestinal ou combinado com sais biliares. Estas substâncias podem também ser diretamente absorvidas ou transformadas nos tecidos do enterócito. Ao serem absorvidas, são normalmente transformadas no fígado em substâncias mais hidrofílicas

(BROOKER; ACAMOVIC, 2005). Como exemplo, pode haver a conversão em compostos polares pela união com glicoronato ($C_6H_9O_7^-$), sendo assim excretados na urina (KOHLERT et al., 2000). Algumas das reações de transformação ocorrem por conjugação com aminoácidos, o que pode ser prejudicial ao animal, tanto do ponto de vista protéico como energético (BROOKER; ACAMOVIC, 2005). Contudo, a rápida metabolização e a meia-vida curta levam a crer que o risco de acúmulo nos tecidos é baixo (KOHLERT et al., 2000).

Degradação ambiental. Óleos essenciais podem ter sua integridade afetada pelo processamento industrial e mau armazenamento. Os três principais causadores de degradação são o oxigênio atmosférico, o calor e a luz (TISSERAND, 1996a). A oxidação atmosférica é mais danosa sobre os terpenos, a exemplo do limoneno e pineno. Conjuntamente, o calor e a luz aceleram a oxidação (TISSERAND, 1996a; GUIMARÃES et al., 2008). Por este motivo, óleos essenciais são sempre armazenados em frascos escuros, ao abrigo da luz e sob temperaturas amenas.

A perda de atividade antimicrobiana já foi demonstrada ao se oxidar o óleo de capim-limão (ORAFIDIYA, 1993). A degradação pode também resultar na produção de compostos nocivos, capazes de causar sensibilidade à pele ou o surgimento de tumores, por exemplo (TISSERAND, 1996a).

Estas questões trazem complicação ao uso comercial de óleos essenciais. Da mesma forma, podem interferir em resultados experimentais, principalmente aqueles de longa duração relacionados ao desempenho animal, já que envolvem o armazenamento por longos períodos, processamento de ração e exposição a condições ambientais.

2.3.6 Outras aplicações na produção de ruminantes

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

Exemplos de aplicações não nutricionais são a ação anti-helmíntica, inseticida e antioxidante (ROCHFORT; PARKER; DUNSHEA, 2008). Também já se pesquisou o

efeito dos óleos essenciais no padrão fermentativo e na estabilidade aeróbia da silagem de milho (KUNG JR. et al., 2008), assim como nos processos de peptidólise e deaminação durante a ensilagem de azevém (FOSKOLOS et al., 2010). O uso de óleos essenciais no combate aos odores produzidos pelo esterco acumulado na criação de animais confinados é outro exemplo de aplicação (VAREL, 2002).

Por fim, há interesse quanto à ação sobre a população de microrganismos patogênicos de origem alimentar. Como exemplo, carvacrol e timol diminuíram a concentração de coliformes no esterco (VAREL, 2002). Helander et al. (1998) e Elgayyar et al. (2001) verificaram que o óleo de orégano e seus dois principais constituintes (carvacrol e timol) inibiram a bactéria patogênica *Escherichia coli* O157:H7. Da mesma forma, carvacrol e timol também inibiram várias cepas de *E. coli* O157:H7 durante a fermentação ruminal *in vitro* (RIVAS et al., 2010).

2.4 As plantas selecionadas, seus óleos essenciais e ação antimicrobiana

2.4.1 Fatores que influenciam a composição dos óleos essenciais

Óleos essenciais, mesmo oriundos da mesma espécie, apresentam grande variação quanto aos tipos e concentrações de terpenóides e fenilpropanóides. Ao compararmos dados de literatura, é bastante comum encontrarmos divergências quanto à composição de um mesmo tipo de óleo essencial. Isto traz a necessidade de que experimentos informem em detalhes a origem, a forma de obtenção e a composição dos óleos essenciais utilizados, fato este nem sempre observado nas publicações relacionadas à nutrição de ruminantes.

Tais alterações são função do material genético e da variedade da planta (BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007; RETTA et al., 2009; HABER, 2008), do local de cultivo (FURLAN et al., 2010; HABER, 2008), das condições climáticas e agronômicas (MARCO et al., 2007), da época e horário de colheita (BLANK et al., 2007; FURLAN et al., 2010), além do estágio de desenvolvimento da planta (LEAL et al., 2003). Adicionalmente, partes diferentes de uma mesma planta produzem óleos essenciais com composições também distintas (REHDER; SARTORATTO; RODRIGUES, 2006; BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007). Métodos de extração

(fluido supercrítico, destilação a vapor, solventes, etc) também causam variação na composição do óleo (QUISPE-CONDORI et al., 2008), assim como o processamento (ex: secagem; BLANK et al., 2007; BARBOSA et al., 2008) e o armazenamento (GUIMARÃES et al., 2008).

Para sobrepujar essas limitações, na nutrição de ruminantes os produtos comerciais contendo óleos essenciais apresentam em suas formulações substâncias isoladas e purificadas. É comum que empresas sintetizem seus próprios óleos essenciais, em geral utilizando-se de biotransformações microbiológicas (DE CARVALHO; DA FONSECA, 2006). Logo, o principal objetivo não é descobrir óleos essenciais que possam ser diretamente utilizados na nutrição de ruminantes. Por trás disso, está o conceito fundamental de utilizar as plantas como um laboratório, um fornecedor de substâncias potencialmente capazes de manipular a fermentação ruminal. Descobrendo-se efeitos positivos, deixa-se o resto a cargo da indústria química.

2.4.2 Critérios de seleção

Há séculos as propriedades medicinais dos vegetais causam fascínio no ser humano. Substâncias de plantas foram e ainda são utilizadas pelas mais diversas civilizações humanas (egípcios, indianos, chineses, civilizações indígenas das Américas, ribeirinhos da região amazônica, etc) para fins medicinais, religiosos, industriais e alimentícios.

A flora brasileira é indiscutivelmente conhecida por sua variedade e riqueza (LORENZI; MATOS, 2002). A medicina popular utiliza de forma empírica inúmeras plantas com atividades antimicrobianas (COELHO DE SOUZA et al., 2004; BUENO et al., 2005). A etnofarmacologia é a área responsável pela interface entre o conhecimento prático e científico (ELISABETSKY, 2003), contribuindo para que a sabedoria popular seja traduzida em ciência. É vasta a literatura científica sobre as propriedades antimicrobianas de plantas brasileiras.

Neste trabalho selecionamos plantas tendo como principal critério a existência de informações científicas sobre as atividades antimicrobianas de seus compostos secundários. A escolha centrou-se em plantas brasileiras ricas em óleos essenciais, já que nos últimos anos é dada grande atenção ao seu uso na manipulação da

fermentação ruminal. Porém, graças à ampla utilização, três espécies do gênero *Cymbopogon* (origem asiática) foram incluídas neste trabalho. Finalmente, a domesticação agrônômica e o emprego em escala comercial foram também usados como critérios adicionais, porém não determinantes para a escolha ou rejeição. Informações sobre as plantas selecionadas, assim como seus óleos essenciais, são discutidas a seguir.

2.4.3 Erva-baleeira - *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae)

A erva-baleeira, ou salicina, é arbusto de origem brasileira bastante conhecida pelas propriedades anti-inflamatórias. O anti-inflamatório comercial Acheflan® (Aché, Brasil) possui como princípios ativos substâncias obtidas de seu óleo essencial (QUISPE-CONDORI et al., 2008). Carvalho Jr. et al. (2004) determinaram por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM) que os principais compostos do óleo de erva-baleeira são mono e sesquiterpenos, sendo 29,7% α -pineno, 25,3% trans-cariofileno, 10% allo-aromadendreno e 4,6% α -humuleno (Figura 5).

Efeitos antimicrobianos já foram observados, sendo tal propriedade atribuída aos seus óleos essenciais (JORGE et al., 1998). Carvalho Jr. et al. (2004) constataram que 88,8% das bactérias gram-positivas e 93,3% das leveduras testadas foram sensíveis ao óleo essencial de *C. verbenaceae*, enquanto que 80% das bactérias gram-negativas foram resistentes. Ausência de efeito antimicrobiano foi verificado contra 13 sorotipos diferentes de *E. coli* (gram-negativa; DUARTE et al., 2007).

Figura 5 – Fórmula estrutural de alguns terpenos encontrados no óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*)

2.4.4 Aroeira vermelha - *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae)

A aroeira 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-pimenta e aroeirinha (BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007), distinguindo-se da aroeira do cerrado (*Myracrodruon urundeuva*) utilizada na fabricação de dormentes e mourões.

A aroeira possui óleos essenciais nas folhas, 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; BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007; Figura 6).

Figura 6 – Fórmula estrutural de alguns terpenos encontrados no óleo essencial de aroeira vermelha (*Schinus terebinthifolius*)

Vários trabalhos comprovaram atividade antimicrobiana da aroeira, no extrato aquoso (LIMA et al., 2004), no extrato etanólico a 30% (MARTÍNEZ; GONZÁLEZ; BADELL, 1996), no extrato hidroalcoólico (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2006) e nos óleos essenciais (SILVA et al., 2010). Neste trabalho selecionamos os óleos essenciais de aroeira extraídos das folhas e dos frutos.

2.4.5 Capim cidreira - *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae)

Sendo também popularmente denominado de capim-limão, capim-santo ou capim-cidrão (LORENZI; MATOS, 2002), o capim cidreira é originário da Ásia, internacionalmente chamado de capim-limão da Índia Ocidental (*West Indian lemongrass*). De uso muito popular no Brasil, é conhecido por suas propriedades ansiolíticas e anti-hipertensivas.

O principal componente de seu óleo essencial é o citral, composto pela mistura dos isômeros neral (β -citral) e geranial (α -citral; LEAL et al., 2003). O geraniol, limoneno, citronelal e mirceno são também encontrados em seu óleo essencial (GUERRA et al., 2000; Figura 7).

Figura 7 – Fórmula estrutural de alguns terpenos encontrados nos óleos essenciais de capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), capim limão (*Cymbopogon flexuosus*) e citronela (*Cymbopogon winterianum*). Adaptado de Barbosa et al. (2008)

As atividades antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial de *C. citratus* foram atribuídas principalmente ao citral (GUERRA et al., 2000). Vários são os trabalhos que comprovaram a ação antimicrobiana (ONAWUNMI et al., 1984; OUSSALAH et al., 2007; SANTOS et al., 2009; ZAGO et al., 2009), inclusive com a evidência de que bactérias gram-positivas foram mais sensíveis do que as gram-negativas (NAIK et al., 2010).

2.4.6 Capim limão - *Cymbopogon flexuosus* (DC.) Stapf (Poaceae)

É planta do mesmo gênero do capim cidreira, porém de existência mais rara no Brasil. Em geral, recebe o nome internacional de capim limão da Índia Oriental (*East Indian lemongrass*). Contudo, muitas vezes ambas as plantas recebem a mesma denominação popular (MAY et al., 2008).

Seu óleo essencial é rico em citral (a mistura de neral e geranial; Figura 7), chegando à concentração de 60% (TASKINEN; MATHELA; MATHELA, 1983) e 61% (KUMAR et al., 2009) do óleo total. Efeitos antifúngicos (KUMAR et al., 2009) e antibacterianos (OUSSALAH et al., 2006, 2007) moderados já foram constatados no óleo de capim-limão, basicamente atribuídos ao citral.

2.4.7 Citronela - *Cymbopogon winterianum* Jowitt. (Poaceae)

A citronela, ou citronela de Java, é nacionalmente reconhecida por suas propriedades repelentes. Verificou-se grande variação na composição do seu óleo essencial devido à época do ano e momento da colheita, possuindo em média 26% do aldeído citronelal, 14% de citronelol e 41% de geraniol (BLANK et al., 2007). Já Marco et al. (2007) observaram 44,3% da mistura citronelal + citronelol e 32% de geraniol (Figura 7).

Efeitos antibacterianos moderados já foram constatados para seu óleo essencial (OUSSALAH et al., 2007). Da mesma forma, o óleo de citronela mostrou ser bastante eficaz contra 6 dos 13 sorotipos testados de *E. coli*, sendo sua propriedade antimicrobiana principalmente atribuída ao geraniol (DUARTE et al., 2007).

Experimentos com novilhos de corte indicaram que a adição de 100 g/d de folhas de citronela secas e moídas aumentou a digestibilidade da MS, diminuiu a concentração de NH₃ ruminal e de protozoários, além de aumentar o número de bactérias viáveis no rúmen (WANAPAT et al., 2008).

2.4.8 Macela - *Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. (Asteraceae)

Também chamada de marcela ou macela-do-campo, é encontrada na região sul do Brasil. É planta herbácea de porte médio com inflorescências brancas e amarelas bem características. Suas flores são muito utilizadas dentro de travesseiros, auxiliando no combate à bronquite e crises asmáticas (SOUZA BRITO; SOUZA BRITO, 1993). Plantas cultivadas na Argentina apresentaram em seu óleo essencial 39,7% de E-cariofileno, 14,2% de α -copaeno, 9,4% de δ -cadineno e 3,2% de α -muurulol (GILLIJ; GLEISER; ZYGADLO, 2008). Propriedades antimicrobianas já foram comprovadas em plantas do gênero *Achyrocline* sp. (GUTKIND et al., 1981, 1984), todavia não se comprovou efeito da *A. satureoides* sobre diferentes sorotipos de *E. coli* (DUARTE et al., 2007).

2.4.9 Guaco - *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae)

O guaco é planta trepadeira nativa da Mata Atlântica e cultivada por todo o território nacional. Outros nomes populares são erva-de-cobra e coração-de-jesus (LORENZI; MATOS, 2002). Suas folhas são popularmente usadas como tônico, estimulante do apetite, antigripal e anti-inflamatório.

Segundo Rehder, Sartoratto e Rodrigues (2006), as concentrações dos principais componentes do óleo essencial das folhas de guaco foram 23,4% de germacreno-D, 21,3% de β -cariofileno, 11,4% de biciclogermacreno e 9,9% de δ -elemeno. Várias pesquisas indicaram a atividade antimicrobiana do guaco (DUARTE et al., 2004; YATSUDA et al., 2005; SOUZA et al., 2006). Todavia, resultados negativos foram constatados por Duarte et al. (2007), em que o óleo essencial de guaco não inibiu o crescimento de nenhum dos 13 sorotipos de *E. coli* testados.

2.4.10 Carqueja - *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. (Asteraceae)

A carqueja é também chamada de carqueja-amarga. Está entre as plantas medicinais mais comercializadas no Brasil, com plantações presentes no Estado do

Paraná. Plantas do gênero da carqueja são de fácil identificação, pois são desprovidas de folhas e apresentam caules trifacetados bastante peculiares. Todavia, é difícil a sua diferenciação por espécie. A *Baccharis trimera* talvez seja a mais conhecida delas, porém outros exemplos são a *B. cylindrica*, *B. dracunculifolia*, *B. articulata* e *B. gaudichaudiana* (BUDEL; DUARTE; SANTOS, 2004ab).

O efeito antimicrobiano já foi comprovado para a *B. trimera* (AVANCINI; WIEST; MUNDSTOCK, 2000; BETONI et al., 2006), inclusive com informações de que o extrato da planta foi mais eficaz contra microorganismos gram-positivos do que contra gram-negativos (AVANCINI et al., 2000). Análise do óleo essencial de *B. trimera* demonstrou que seus principais componentes são carquejil acetato, δ -cadineno, germacreno, palustrol, d-limoneno e β -eudesmol (VARGAS et al., 2006). Em outro estudo, os principais constituintes de quatro espécies de *Baccharis* sp. foram espatulenol, β -pineno, óxido de cariofileno, germacreno e limoneno (RETTA et al., 2009).

2.4.11 Arnica - *Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae)

Popularmente conhecida por arnica-mineira, a *L. pinaster* é natural dos Cerrados brasileiros, comumente encontrada nos Estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia. É também conhecida por arnica-da-serra ou candeia, sendo comum seu uso em infusões, banhos ou macerada na cachaça (SILVEIRA et al., 2005). Segundo Haber (2008), os principais constituintes do óleo essencial de arnica são o trans-cinamato de metila e o trans-cariofileno, com concentrações de 51,2 e 15,4%, respectivamente. Plantas do gênero *Lychnophora* apresentam atividade antimicrobiana comprovada (MIGUEL et al., 1996; BORELLA et al., 1998).

2.4.12 Copaíbas - *Copaifera* sp. (Leguminosae - Caesalpinioideae)

Várias são as espécies incluídas no gênero *Copaifera* sp.: *C. langsdorfii*, *C. multijuga*, *C. martii*, *C. cearensis*, *C. paupera*, *C. officinalis*, *C. lucens* e *C. reticulata*. Outros nomes populares para estas plantas são copaíba e pau d'óleo.

É árvore natural da região amazônica, famosa pelo seu bálsamo (óleo-resina) que é obtido diretamente do tronco. Seus óleos apresentam grande quantidade de sesquiterpenos (mais de 40) e diterpenos (28 no total; VEIGA JR.; PINTO; PATITUCCI, 1997; VEIGA JR.; PINTO, 2002). O principal composto do óleo de copaíba é o trans-cariofileno (CASCON; GILBERT, 2000; GOMES et al., 2007). Estudos demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba (PACHECO et al., 2006; SANTOS et al., 2008; PIERI et al., 2010), inclusive constatando-se maior efetividade contra microrganismos gram-positivos do que gram-negativos (PACHECO et al., 2006).

Para este trabalho, foram selecionados os óleos resinóides de copaíba mari-mari (*Copaifera reticulata* Ducke), copaíba angelim (*Copaifera multijuga* Hayne), copaíba zoró (*Copaifera langsdorfii* Desf.) e copaíba vermelha (*Copaifera langsdorfii* Desf.).

2.5 A técnica *in vitro* de produção de gás

Sistemas de fermentação *in vitro* são amplamente utilizados na identificação de substâncias de plantas capazes de manipular a fermentação ruminal (SELJE et al., 2007; BODAS et al., 2008; CASTILLEJOS et al., 2008; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008; SOLIVA et al., 2008).

Várias são as técnicas *in vitro* de produção de gás (GETACHEW et al., 1998). Dentre as principais vantagens dos métodos *in vitro*, encontram-se o baixo custo, a rapidez na obtenção de resultados, o elevado controle ambiental e a possibilidade de se trabalhar com grande número de tratamentos e baixas quantidades de amostra (MAKKAR, 2005). Graças a isto, é a técnica geralmente utilizada nas fases iniciais de pesquisa com compostos secundários.

Técnicas *in vitro* gás apresentam ainda outros benefícios. Mensurar o gás produzido durante a degradação permite que estudos de cinética de fermentação sejam feitos com menor número de amostras, já que ao longo do tempo todas as medidas são tomadas de uma única amostra. Somado a isto, o gás gerado é resultado tanto da degradação da fração insolúvel como da fração solúvel do substrato incubado.

Estas características constituem-se em evidente vantagem frente ao método gravimétrico de degradação *in vitro* de Tilley e Terry. Neste último, dados de cinética

fermentativa não podem ser obtidos de uma única amostra, pois a determinação do resíduo pós-incubação destrói a amostra incubada (GETACHEW et al., 1998). Finalmente, sistemas *in vitro* capazes de aprisionar o gás gerado durante a fermentação possibilitam determinar a concentração de CH₄ e de outros gases (CO₂, H₂S, etc). Por esta razão, técnicas *in vitro* gás são sempre utilizadas em estudos com aditivos antimetanogênicos.

Os princípios físicos e químicos dos gases (as cinco leis fundamentais dos gases; lei de Boyle, Charles, Avogadro, lei dos gases ideais e lei de Dalton) são a base do conhecimento para se entender a técnica de produção de gás, muito bem revisados em Theodorou et al. (1998).

Ao se incubar alimento com fluido ruminal tamponado, carboidratos são fermentados até AGCC, produzindo gases (ex: CO₂ e CH₄) e células microbianas. Uma característica bastante interessante desta técnica é que, ao se combinar mensurações de gás e de degradação de alimento (mL de gás/g MO_{degradada}), obtêm-se uma variável capaz de relacionar a proporção de substrato fermentado com a proporção de substrato incorporado na massa microbiana (RYMER et al., 2005).

O gás produzido *in vitro* não é apenas resultado direto da degradação do substrato, pois também é indiretamente gerado pelo tamponamento dos AGCC ($H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$). O volume de gás oriundo da degradação de proteína e gorduras é pequeno, podendo ser negligenciado. Ao se incubar forragem, aproximadamente 50% do total de gás produzido são oriundos do tamponamento do meio, sendo aproximadamente 60% para amostras ricas em concentrado (GETACHEW et al., 1998).

As alterações nas proporções molares de AGCC levam a alterações no volume de gás produzido. O gás oriundo da degradação de substrato é formado somente quando acetato e butirato são produzidos, não havendo geração de gás ao se fermentar carboidratos até propionato (WOLIN, 1960). Para se compreender melhor as relações estequiométricas, assim como os balanços e inter-relações entre os produtos finais de fermentação (AGCC, CO₂, CH₄, massa microbiana e resíduo não degradado), ótimas revisões são as de Blümmel, Makkar e Becker (1997) e Makkar (2004).

Várias são as peculiaridades de cada técnica *in vitro* gás. São muitos os fatores que influenciam a produção de gás, já extensivamente revisados por Cone (1998), Getachew et al. (1998), Makkar (2005), Mould et al. (2005) e Rymer et al. (2005). Dentre as fontes de variação estão a quantidade e o tamanho de partícula do alimento incubado, o volume do *headspace* (volume do frasco permitido ao acúmulo de gás), a relação entre os volumes de inóculo e meio de incubação (solução tampão + solução de macrominerais, microminerais e solução redutora), além do método de agitação dos frascos. Além disso, são também importantes o controle do pH do meio, juntamente com a concentração e os tipos de sais tamponantes utilizados.

Por fim, há que se considerar ainda a variação causada pelo inóculo ruminal. Animais diferentes produzem inóculos com atividades microbianas também diferentes, inclusive com variação temporal dentro do mesmo animal (MOULD et al., 2005). Logicamente que o tipo de alimentação fornecida ao animal também é importante fator a ser considerado.

A técnica *in vitro* de produção de gás utilizada neste trabalho foi a semiautomática com transdutor de pressão descrita em Theodorou et al. (1994) e Maurício et al. (1999). Frascos de vidro são preenchidos com líquido ruminal + meio de incubação + substrato, sendo em seguida selados e incubados em estufa, permitindo dessa forma o acúmulo de gás dentro do frasco. A pressão interna do frasco é determinada periodicamente com o uso de transdutor de pressão. Logo, determina-se o volume de gás produzido utilizando curva de regressão “pressão × volume de gás” previamente definida para as condições laboratoriais. Conjuntamente com as leituras de pressão, são realizadas amostragens de gás, que é armazenado em tubos a vácuo. Assim, posteriormente determina-se a concentração de CH₄ no gás produzido. Esta é uma técnica robusta, precisa e que permite a incubação simultânea de muitas amostras (até 200 amostras aproximadamente).

Referências

ANDO, S.; NISHIDA, T.; ISHIDA, M.; HOSODA, K.; BAYARU, E. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 82, n. 2/3, p. 245-248, 2003.

AVANCINI, C.A.M.; WIEST, J.M.; MUNDSTOCK, E. Atividade bacteriostática e bactericida do decocto de *Baccharis trimera* (Less.) D. C., Compositae, carqueja, como desinfetante ou anti-séptico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52 n. 3, p. 230-234, 2000.

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.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* RADDI. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARBOSA, L.C.A.; PEREIRA, U.A.; MARTINAZZO, A.P.; MALTHA, C.R.A.; TEIXEIRA, R.R.; MELO, E.C. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf samples. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 8, p. 1864-1874, 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.

BENCHAAR, C.; CHOUINARD, P.Y. Short communication: assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 7, p. 3392-3396, 2009.

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

BENCHAAR, 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.

BENCHAAR, C.; PETIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; WHYTE, T.D.; CHOUINARD, P.Y. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 4352-4364, 2006.

BENCHAAR, C.; PETIT, H.V.; BERTHIAUME, R.; OUELLET, D.R.; CHIQUETTE, J.; CHOUINARD, P.Y. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 886-897, 2007.

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

BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; DI STASI, L.C.; FERNANDES JR., A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 4, p. 387-390, 2006.

BLANK, A.F.; COSTA, A.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; INNECCO, R.; EHLERT, P.A.D.; SOUSA, I.F. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 557-564, 2007.

BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 77, n. 1, p. 24-34, 1997.

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

BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, A.B.; WALLACE, R.J.; GONZÁLEZ, J.S. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 245-258, 2008.

BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W.R.; HERTZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora villosissima*. **Biochemical Systematics Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 6, p. 671-676, 1998.

BROOKER, J.D.; ACAMOVIC, T. Phytochemicals in livestock production systems. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 121, n. 1/2, p. 1-4, 2005.

BROUDISCOU, L.P.; CORNU, A.; ROUZEAU, A. *In vitro* degradation of 10 mono- and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro-organisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 9, p. 1653-1658, 2007.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros para análise de carqueja: comparação entre quatro espécies de *Baccharis* spp. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 41-48, 2004a.

_____. Stem morpho-anatomy of *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 93-99, 2004b.

BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O.; COSTA, R.B.; POTT, A.; POTT, V.J.; SCHEIDT, G.N.; BATISTA, M.S. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guaraní indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 39-44, 2005.

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.; KAMEL, C. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 2, p. 761-771, 2006.

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

_____. 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.

CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; REYNOLDS, C.K.; KRISTENSEN, N.B.; VAN VUUREN, A.M. Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. **Animal**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 1184-1196, 2010.

CAMPBELL, E.J.; FROST, R.A.; MOSLEY, T.K.; MOSLEY, J.C.; LUPTON, C.J.; TAYLOR, JR., C.A.; WALKER, J.W.; WALDRON, D.F.; MUSSER, J. Pharmacokinetic differences in exposure to camphor following intraruminal dosing in selectively bred lines of goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 8, p. 2620-2626, 2010.

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.

_____. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.

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

CARVALHO JR., P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 95, n. 2/3, p. 297-301, 2004.

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

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

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

CASTILLEJOS, L.; 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, 2005.

_____. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 132, n. 3/4, p. 186-201, 2007.

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

CERRI, C.C.; MAIA, S.M.F.; GALDOS, M.V.; CERRI, C.E.P.; FEIGL, B.J.; BERNOUX, M. Brazilian greenhouse gas emissions: the importance of agriculture and livestock. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 6, p. 831-843, 2009.

CHAVES, A.V.; STANFORD, K.; GIBSON, L.L.; McALLISTER, T.A.; BENCHAAR, C. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1-4, p. 396-408, 2008a.

CHAVES, A.V.; STANFORD, K.; DUNGAN, M.E.R.; GIBSON, L.L.; McALLISTER, T.A.; VAN HERK, F.; BENCHAAR, 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**, Amsterdam, v. 117, n. 2/3, p. 215-224, 2008b.

CHMELOVÁ, S.; TRÍSKA, J.; RUZICKOVÁ, K.; KALAC, P. Determination of aliphatic aldehydes in maize and grass silages using onfibre derivatisation with O(2,3,4,5,6pentafluoro)benzylhydroxylamine. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 152, n. 1/2, p. 152-160, 2009.

CHION, A.R.; TABACCO, E.; GIACCONE, D.; PEIRETTI, P.G.; BATTELLI, G.; BORREANI, G. Variation of fatty acid and terpene profiles in mountain milk and "Toma piemontese" cheese as affected by diet composition in different seasons. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 393-399, 2010.

CHIZZOLA, R.; HOCHSTEINER, W.; HAJEK, S. GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twigs in the Rusitec system. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 77-82, 2004.

COELHO DE SOUZA, G.; HAAS, A.P.S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

CONE, J.W. The development, use and application of the gas production technique at the DLO Institute for Animal Science and Helath (ID-DLO), Lelystad, The Netherlands. In: DEAVILLE, E.R.; OWEN, E.; ADESOGAN, A.T.; RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; LAWRENCE, T.L.J. (Ed.). **In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants**. Edinburgh: British Society of Animal Science, 1998. p. 65-78. (Occasional Publication, 22).

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

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

DE CARVALHO, C.C.C.R.; DA FONSECA, M.M.R. Biotransformation of terpenes. **Biotechnology Advances**, Amsterdam, v. 24, n. 2, p. 134-142, 2006.

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

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P.M.; DELARMELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da

coleção de plantas medicinais do CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 6-8, 2004.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELENA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

DURMIC, Z.; MCSWEENEY, C.S.; KEMP, G.W.; HUTTON, P.; WALLACE, R.J.; VERCOE, P.E. Australian plants with potential to inhibit bacteria and processes involved in ruminal biohydrogenation of fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 271-284, 2008.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F.A.; GOLDEN, D.A.; MOUNT, J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, 2001.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 35-36, 2003.

ESTELL, R.E.; FREDRICKSON, E.L.; ANDERSON, D.M.; HAVSTAD, K.M.; REMMENG, M.D. Effects of individual terpenes on consumption of alfalfa pellets by sheep. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1636-1640, 2000.

_____. Effects of four mono- and sesquiterpenes on the consumption of alfalfa pellets by sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3301-3306, 2002.

ESTELL, R.E.; FREDRICKSON, E.L.; TELLEZ, M.R.; HAVSTAD, K.M.; SHUPE, W.L.; ANDERSON, D.M.; REMMENG, M.D. Effects of volatile compounds on consumption of alfalfa pellets by sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 228-233, 1998.

EUGÈNE, M.; ARCHIMÈDE, H.; SAUVANT, D. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 81-97, 2004.

FANDIÑO, I.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; BLANCH, M. Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 409-417, 2008.

FELDBERG, R.S.; CHANG, S.C.; KOTIK, A.N.; NADLER, M.; NEUWIRTH, Z.; SUNDSTROM, D.C.; THOMPSON, N.H. *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 32, n. 12, p. 1763-1768, 1988.

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

FONSECA, A.J.M.; DIAS-DA-SILVA, A.A. Efeitos da eliminação dos protozoários do rúmen no desempenho produtivo de ruminantes - revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 96, n. 1, p. 60-64, 2001.

FOSKOLOS, A.; CAVINI, S.; RODRIGUEZ-PRADO, M.; FERRET, A.; CALSAMIGLIA, S. A screening test of the use of essential oils compounds on ryegrass silage for preventing nitrogen losses in sustainable production systems. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ENERGY AND PROTEIN METABOLISM AND NUTRITION, 2010, Parma. **Proceedings...** Parma:European Association of Animal Production, 2010, publication n° 127, p. 451-452.

FURLAN, M.R.; MARTINS, R.C.C.; RODRIGUES, E.; SCALCO, N.; NEGRI, G.; LAGO, J.H.G. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC.) Staf, Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, 2010. No prelo.

GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BODAS, R.; GONZÁLEZ, J.S. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 36-52, 2008.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 3/4, p. 261-281, 1998.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 7, p. 2507-2515, 2008.

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 486-492, 2007.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais nativas contra bactérias encontradas em úlceras de decúbito. **O Biológico**, São Paulo, v. 68, p. 133-137, 2006.

GRIFFIN, S.G.; WYLLIE, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 322-332, 1999.

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

GUIMARÃES, L.G.; CARDOSO, M.G.; ZACARONI, L.M.; LIMA, R.K. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). **Quimica Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUTKIND, G.O.; MARTINO, V.S.; GRANA, N.; COUSSIO, J.D.; TORRES, R. Screening of South American plants for biological activities. 1. Antibacterial and antifungal activity. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 5, n. 2, p. 213-218, 1981.

GUTKIND, G.O.; NORBEDO, C.; MOLLEARCH, M.; FERRARO, G.; COUSSIO, J.D.; TORRES, R. Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 319-321, 1984.

HABER, L.L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* MART.** 2008. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008. Disponível em: http://www.fca.unesp.br/pos_graduacao/Teses/PDFs/Arq0255.pdf. Acesso em: 17 out. 2010.

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.

HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H. -L.; 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.

HOSODA, K.; NISHIDA, T.; PARK, W.Y.; ERUDEN, B. Influence of *Mentha piperita* L. (peppermint) supplementation on nutrient digestibility and energy metabolism in lactating dairy cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Suweon, v. 18, n. 12, p. 1721-1726, 2005.

HRISTOV, A.N.; TEKIPPE, J.A.; HEYLER, K.S.; CASSIDY, T.W.; ZHELJAZKOV, 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. 533 p.

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

JORGE, L.I.F.; MARKAMAN, B.E.O.; GONZALEZ, E.; FERRO, V.O. Identificação de *Cordia verbenaceae* D.C. (erva baleeira) como fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 69-71, 1998.

JOUANY, J.P.; DEMEYER, D.I.; GRAIN, J. Effect of defaunating the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 21, n. 2/4, p. 229-265, 1988.

JUVEN, B.J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 6, p. 626-631, 1994.

KALAC, P. The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: a review. **Food Chemistry**, Amsterdam, 2010. In press.

KAMRA, D.N.; AGARWAL, N.; CHAUDHARY, L.C. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 156-163, 2006.

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

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

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, B.; WEIGAND, H.; WEISS, N. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 1, n. 1, p. 119-128, 1989.

KOHLERT, C.; VAN RENSEN, I.; MARZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E.U.; VEIT, M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animal and humans. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, p. 495-505, 2000.

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.

KUNG JR., L.; WILLIAMS, P.; SCHMIDT, R.J.; HU, W. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 4793-4800, 2008.

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

LEAL, T.C.A.B.; FREITAS, S.P.; SILVA, J.F.; CARVALHO, A.J.C. Produção de biomassa e óleo essencial em plantas de capim cidreira [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf] em diferentes idades. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 61-64, 2003.

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.

LOURENÇO, M.; CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FIEVEZ, V. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3045-3053, 2008.

MAKKAR, H.P.S. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: FAO. **FAO animal production and health 160**: assessing quality and safety of animal feeds. Rome, 2004. chap. 3, p. 55-88. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5159e/y5159e00.pdf>. Acesso em: 22 set. 2010.

_____. *In vitro* gas methods for the evaluation of feeds containing phytochemicals. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 1, p. 291-302, 2005.

MALECKY, M.; BROUDISCOU, L.P. Disappearance of nine monoterpenes exposed *in vitro* to the rumen microflora of dairy goats: effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 1366-1373, 2009.

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

MARCO, C.A.; INNECCO, R.; MATTOS, S.H.; BORGES, N.S.S.; NAGAO, E.O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 429-432, 2007.

MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the transformation of limonene from orange essential oil, using cassaca waste as medium. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 345-350, 2007.

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.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

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.

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.

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

MEALE, S.J.; CHAVES, A.V.; SCHEI, I.; McALLISTER, T.A.; IWAASA, A.D.; YANG, W.Z.; BENCHAAR, C. Including essential oils in ruminal batch cultures, or in diets fed to lactating dairy cows: effects on methane emissions. In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 4., 2010, Banff. **Proceedings...** Banff, 2010. p. 136.

MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 85-88, 1997.

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.

MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; DELLE MONACHE F.; BELLA CRUZ, A.; BELLA CRUZ, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia* (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, London, v. 10, n. 8, p. 694-696, 1996.

MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G.; PERDUE, E.M.; ARAUJO, R. Aerobic biodegradation of selected monoterpenes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 6, p. 831-838, 1996.

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.

MOLERO, R.; IBARS, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; LOSA, R. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 114, n. 1/4, p. 91-104, 2004.

MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R.M. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 1, p. 31-50, 2005.

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

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

NEWBOLD, C.J.; RODE, L.M. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 138-147, 2006.

NEWBOLD, C.L.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. The importance of methanogenesis associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 230-234, 1995.

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

NONI, I.; BATTELLI, G. Terpenes and fatty acid profiles of milk fat and "Bitto" cheese as affected by transhumance of cows on different mountain pastures. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 299-309, 2008.

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

OHENE-ADJEI, S.; CHAVES, A.V.; McALLISTER, T.A.; BENCHAAAR, C.; TEATHER, R.M.; FOSTER, R.J. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. **Microbial Ecology**, New York, v. 56, n. 2, p. 234-242, 2008.

ONAWUNMI, G.O.; YISAK, W.A.; OGUNLANA, E.O. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 279-286, 1984.

ORAFIDIYA, L.O. The effect of autoxidation of lemongrass oil on its antibacterial activity. **Phytotherapy Research**, London, v. 7, n. 3, p. 269-271, 1993.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.

_____. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Amsterdam, v. 18 n. 5, p. 414-420, 2007.

PACHECO, T.A.R.C.; BARATA, L.E.S.; DUARTE, M.C.T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p. 123-124, 2006.

PIERI, F.A.; JOSÉ, R.M.; GALVÃO, N.N.; NERO, L.A.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 8, p. 1791-1801, 2010.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Control de microorganismos por agentes físicos y químicos. **Microbiología**. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2004. p. 145-162.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.S.; PEDREIRA, M.S.; LIMA, M.A.; BERCHIELLI, T.T.; BARBOSA, P.F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004.

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

QUISPE-CONDORI, S.; FOGGIO, M.A.; ROSA, P.T.V.; ANGELA, M.; MEIRELES, M.A.A. Obtaining β -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2008.

REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M.V.N. Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p.116-118, 2006.

RETTA, D.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; LIRA, P.L.; VAN BARENA, C.; BANDONIA, A. Volatile constituents of five *Baccharis* species from northeastern Argentina. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 7, p. 1379-1384, 2009.

RIVAS, L.; MCDONNELL, M.J.; BURGESS, C.M.; O'BRIEN, M.; NAVARRO-VILLA, A.; FANNING, A.; DUFFY, G. Inhibition of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in model broth and rumen by carvacrol and thymol. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 1/2, p. 70-78, 2010.

ROCHFORT, S.; PARKER, A.J.; DUNSHEA, F.R. Plant bioactives for ruminant health and productivity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 299-322, 2008.

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

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

RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 1, p. 9-30, 2005.

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

SANTOS, 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, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-281, 2008.

SANTOS, A.; PADUAN, R.H.; GAZIN, Z.C.; JACOMASSI, E.; D'OLIVEIRA, P.S.; CORTEZ, D.A.G.; CORTEZ, L.E.R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de

sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 436-441, 2009.

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.

SELJE, N.; HOFFMANN, E.M.; MUETZEL, S.; NINGRAT, R.; WALLACE, R.J.; BECKER, K. Results of a screening programme to identify plants or plant extracts that inhibit ruminal protein degradation. **The British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 98, n. 1, p. 45-53, 2007.

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

SILVA, A.B.; SILVA, T.; FRANCO, E.S.; RABELO, S.A.; LIMA, E.R.; MOTA, R.A.; CÂMARA, C.A.G.; PONTES-FILHO, N.T.; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial activity, chemical composition, and cytotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, RADDI). **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 1 p. 158-163, 2010.

SILVEIRA, D.; WAGNER, H.; CHIARI, E.; LOMBARDI, J.A.; ASSUNÇÃO, A.C.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S. Biological activity of the aqueous extract of *Lychnophora pinaster* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 294-297, 2005.

SMITH-PALMER, A.J.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOLIVA, C.R.; ZELEKE, A.B.; CLÉMENT, C.; HESS, H.D.; FIEVEZ, V.; KREUZER, M. *In vitro* screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 53-71, 2008.

SOUZA, D.H.; YAMAMOTO, C.H.; PINHO, J.J.R.G.; ALVES, M.S.; ARAÚJO, A.L.A.; SOUSA, O.V. Atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus mutans* e estabilidade de produtos naturais contendo extrato de *Mikania glomerata* Sprengel. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 32, n. 1, p. 11-14, 2006.

SOUZA BRITO, A.R.M.; SOUZA BRITO, A.A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 53-67, 1993.

SPANGHERO, M.; ROBINSON, P.H.; ZANFI, C.; FABBRO, E. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating

primiparous cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 153, n. 1/2, p. 153-157, 2009.

SPANGHERO, M.; ZANFI, C.; FABBRO, E.; SCICUTELLA, N.; CARNELLINI, C. Effects of a blend of essential oil on some end products of *in vitro* rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 364-374, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. In: _____. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 13, p. 309-334.

TASKINEN, J.; MATHELA, D.K.; MATHELA, C.S. Composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 262, p. 364-366, 1983.

TASSOUL, M.D.; SHAVER, R D. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1734-1740, 2009.

THEODOROU, M.K.; LOWMAN, R.S.; DAVIES, Z.S.; CUDDEFORD, D.; OWEN, E. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. In: DEAVILLE, E.R.; OWEN, E.; ADESOGAN, A.T.; RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; LAWRENCE, T.L.J. (Ed.). ***In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants**. Edinburgh: British Society of Animal Science, 1998. p. 55-63. (Occasional Publication, 22).

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.

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.

TISSERAND, R. Essential oil – safety I. **The International Journal of Aromaterapy**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996a.

_____. Essential oil – safety II: metabolism, neurotoxicity, reproductive toxicity. **The International Journal of Aromaterapy**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 26-29, 1996b.

_____. Essential oil – safety III: carcinogenesis, phototoxicity. **The International Journal of Aromaterapy**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 23-27, 1997.

TORNAMBÉ, G.; CORNU, A.; PRADEL, P.; KONDOYAN, N.; CARNAT, A.P.; PETIT, M.; MARTIN, B. Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 6, p. 2309-2319, 2006.

UEGAKI, R.; SADA, A.; MOTOHIKO, I.; OSAMU, T.; KAZUKI, S.; KATSUMI, N.; YOSHIHIRO, K. Antioxidative activity of milk from cows fed herbs. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, Tokyo, v. 75, n. 6, p. 669-671, 2001

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

ULTEE, A.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.

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

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

VAREL, V.H. Livestock manure odor abatement with plant-derived oils and nitrogen conservation with urease inhibitors: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 2, p. E1-E7, 2002.

VARGA, G.; BLOCK, E.; WILLIAMS, P.; CASSIDY, T.W.; LOSA, R. Effect os CRINA RUMINANTS, a mixture of essential oil components, on continuous culture fermentation and milk production of lactating cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, suppl. 1, p. 334, 2004.

VARGAS, R.M.F.; CASSEL, E.; GOMES, G.M.F.; LONGHI, L.G.S.; ATTI-SERAFINI, L.; ATTI-SANTOS, A.C. Supercritical extraction of carqueja essential oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 375-382, 2006.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; PATITUCCI, M.L. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 612-615, 1997.

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

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

WEEDAKON, C.N.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n. 3, p. 280-283, 1995.

WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, n. 10, p. 1452-1459, 1960.

WOOD, T.A.; RAMOS-MORALES, E.; McKAIN, N.; SHEN, X.; ATASOGLU, C.; WALLACE, R.J. *Chrysanthemum coronarium* as a modulator of fatty acid biohydrogenation in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 161, n. 1, p. 28-37, 2010.

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

YANG, W.Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B.N.; BEAUCHEMIN, K.A. Dose response to eugenol supplementation in growing beef cattle: ruminal fermentation and intestinal digestion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, n. 1/2, p. 57-64, 2010b.

YANG, W.Z.; AMETAJ, B.N.; BENCHAAR, C.; HE, M.L.; BEAUCHEMIN, K.A. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 1082-1092, 2010c.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; MURATA, R.M.; REHDER, V.L.G.; MELO, L.V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 183-189, 2005.

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.

3 EFEITO DO ETANOL NA FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*: UMA ABORDAGEM SOBRE SEU USO EM EXPERIMENTOS COM ÓLEOS ESSENCIAIS E MONENSINA

Resumo

Óleos essenciais são compostos hidrofóbicos e, portanto, pouco miscíveis em água. Em experimentos de fermentação ruminal *in vitro* é comum a diluição dos óleos essenciais em etanol. Etanol é metabolizado no ambiente ruminal, havendo principalmente produção de acetato. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de 10, 100 e 1000 µL de etanol em 75 mL de fluido ruminal tamponado, correspondendo a 0,13; 1,3 e 13,3 µL/mL, respectivamente. Os efeitos do etanol foram independentemente avaliados sob dois tipos de substrato: i) feno de coastcross (*Cynodon* sp.); ii) dieta de 80:20 concentrado:volumoso. Foi utilizado o delineamento em blocos completos ao acaso. A incubação, repetida cinco vezes, foi considerada como bloco. Dois frascos por tratamento foram usados por incubação, sendo a média dos dois frascos considera a repetição. Na incubação de forragem, as doses de 100 e 1000 µL aumentaram ($P < 0,05$) a produção de gás, a concentração de acetato e a relação acetato:propionato ($C_2:C_3$). A degradabilidade verdadeira da matéria orgânica (DVMO) foi reduzida ($P < 0,05$) e a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) aumentou ($P < 0,05$) ao se incluir 1000 µL de etanol. A dose de 10 µL não afetou a fermentação, exceto pela tendência ($P < 0,10$) de aumento na produção de gás. Na incubação da dieta de alto concentrado, a dose de 100 µL aumentou ($P < 0,05$) a concentração total de AGCC, a concentração de acetato e a relação $C_2:C_3$. Houve aumento ($P < 0,05$) de $C_2:C_3$ e tendência ($P < 0,10$) de redução na DVMO ao se incluir 1000 µL de etanol. A dose de 10 µL não afetou a fermentação, exceto pela tendência ($P < 0,10$) de aumento na concentração de valerato. Ao se veicular monensina ou óleos essenciais, sugere-se a utilização da menor dose possível de etanol, o que em nossas condições correspondeu a 10 µL (0,13 µL/mL).

Palavras-chave: Álcool etílico; Compostos secundários de plantas; Metano; Produção de gás

Abstract

Essential oils are hydrophobic compounds, being usual their dilution in ethanol during *in vitro* experiments. In the rumen environment, ethanol is converted mostly to acetate. The objective of this experiment was to evaluate the effects of 10, 100, and 1000 µL of ethanol in 75 mL of buffered rumen fluid, corresponding to 0.13, 1.3, and 13.3 µL/mL, respectively. The effects of ethanol were independently assessed using two types of substrates: i) coastcross (*Cynodon* sp.) hay; ii) 80:20 concentrate:forage diet. A randomized complete block design was used, with incubation considered as a block

being repeated five times. In each incubation, two flasks were used per treatment, thus the mean of two flasks was considered as replicate. When forage was incubated, 100 and 1000 μL of ethanol increased ($P < 0.05$) gas production, acetate concentration, and acetate to propionate ratio ($\text{C}_2:\text{C}_3$). There was a decrease ($P < 0.05$) in the truly degraded organic matter and an increase ($P < 0.05$) in total short-chain fatty acids (SCFA) concentration with inclusion of 1000 μL of ethanol. The inclusion of 10 μL of ethanol had no effects on fermentation, except for the tendency ($P < 0.10$) of gas production increase. When the high-concentrate diet was incubated, 100 μL of ethanol increased ($P < 0.05$) total SCFA and acetate concentration, as well as $\text{C}_2:\text{C}_3$. There was a tendency ($P < 0.10$) for a decrease in the truly degraded organic matter and an increase ($P < 0.05$) in $\text{C}_2:\text{C}_3$ ratio when including 1000 μL of ethanol. The dose of 10 μL did not affect *in vitro* fermentation, except for the tendency ($P < 0.10$) of valerate increase. In order to include essential oils or monensin in the incubation flasks, ethanol should be used at the lowest dose as possible, which corresponded to 10 μL (0.13 $\mu\text{L}/\text{mL}$) in our conditions.

Keywords: Ethyl alcohol; Gas production; Methane; Plant secondary compounds

3.1 Introdução

Técnicas *in vitro* de produção de gás são amplamente utilizadas na avaliação de aditivos ruminais. Nos últimos anos, há crescente interesse pelo uso de óleos essenciais como substitutos aos ionóforos (CALSAMIGLIA et al., 2007; BENCHAAAR et al., 2008). Óleos essenciais são compostos hidrofóbicos, obtidos dos vegetais por extração a vapor ou por solventes. Logo, são pouco miscíveis em água (BAKKALI et al., 2008). Em experimentos de fermentação ruminal *in vitro*, é comum que a veiculação dos óleos essenciais nos frascos de incubação seja feita diluindo-os em etanol.

Nestas pesquisas, monensina sódica é geralmente empregada como controle positivo. Monensina é substância hidrofóbica, sendo também necessária sua solubilização em etanol (BUSQUET et al., 2005; SELJE-ASSMANN; HOFFMANN; BECKER, 2008). Ao se diluir óleos essenciais ou monensina, foram encontradas concentrações finais de etanol bem distintas, como 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de fluido ruminal tamponado (BENCHAAAR et al., 2007; CHAVES et al., 2008), 8 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (MARTÍNEZ et al., 2006; GARCÍA et al., 2007), 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (MACHEBOEUF et al., 2008), 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006; CASTILLEJOS et al., 2008), 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (BUSQUET et al., 2005, 2006), 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (KAMEL et al., 2008) e 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (SELJE-ASSMANN; HOFFMANN; BECKER, 2008).

Embora todos estes estudos tenham informado que iguais concentrações de etanol foram usadas nos controles negativos, relatou-se que 5 µL/mL (MACHEBOEUF et al., 2008), 1 µL/mL (KAMEL et al., 2008) e 0,15 µL/mL (SELJE-ASSMANN; HOFFMANN; BECKER, 2008) não causaram efeito sobre a fermentação ruminal *in vitro*. Todavia, tais estudos não apresentaram resultados para suportar essa afirmação.

Etanol é metabolizado no rúmen, sendo acetato seu principal produto final (CZERKAWSKI; BREKENRIDGE, 1972; DURIX et al., 1991). Durante a oxidação do etanol ocorre transferência interespecífica de hidrogênio para as *Archaea* e, portanto, redução de CO₂ em CH₄. Em fermentação *in vitro*, etanol na concentração de 1,985 µL/mL (34 mM) aumentou em 48, 26 e 40% a produção de CH₄, a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a concentração de acetato, respectivamente (YOSHII; ASANUMA; HINO, 2005). Frente a estas divergências, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de 10, 100 e 1000 µL de etanol em 75 mL de fluido ruminal tamponado, correspondendo a 0,13; 1,3 e 13,3 µL/mL. Assim, buscou-se descobrir a concentração de etanol que não interfira na fermentação ruminal *in vitro*.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Delineamento experimental

O efeito do etanol foi separadamente avaliado utilizando dois substratos: i) feno de Coastcross (*Cynodon* sp.); ii) dieta de 80:20 concentrado:volumoso. O delineamento foi o de blocos completos ao acaso. A incubação, repetida cinco vezes, foi considerada como bloco. Dois frascos por tratamento foram usados em cada incubação, sendo a média dos dois frascos a repetição. Os tratamentos foram: Controle (**CTL**) – substrato + inóculo + meio de incubação; **Et10** – CTL + 10 µL de etanol (0,13 µL/mL); **Et100** – CTL + 100 µL de etanol (1,3 µL/mL); **Et1000** – CTL + 1000 µL de etanol (13,3 µL/mL).

3.2.2 Condições de incubação

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) usando transdutor de

pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba-SP). Os frascos de vidro (volume total = 160 mL; *head space* = 85 mL) foram sequencialmente abastecidos com 500 mg de substrato seco ao ar, 50 mL de meio de incubação (meio de Theodorou descrito em PRESTON, 1995) e 25 mL de inóculo. Imediatamente antes da inoculação, 10, 100 e 1000 µL de etanol absoluto (Carlo Erba, Rodano, Itália) foram adicionados nos respectivos frascos usando pipetas de precisão (pipetas de 0-20, 20-200 e 100-1000 µL; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha). Em seguida, os frascos foram selados com tampas de borracha (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, EUA), agitados manualmente e incubados em estufa de ventilação forçada (Marconi MA35, Piracicaba-SP) a 39°C.

O tempo total de incubação foi 16 h para a dieta de alto concentrado e 24 h para o feno (MAKKAR, 2004). A pressão interna do frasco foi mensurada às 3, 6, 11 e 16 h para a dieta de alto concentrado e às 4, 8, 12 e 24 h para o feno. Em cada leitura, 2,5 mL de gás foram armazenados em tubos a vácuo de 10 mL. Seringas de 5 mL (Becton Dickson Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba-PR) foram usadas na colheita de gás. Após cada amostragem, aliviou-se a pressão interna dos frascos, sendo eles agitados e postos na estufa. Após 16 ou 24 h, os frascos foram imersos em água gelada (4°C).

Para a determinação de AGCC, aproximadamente 10 mL de sobrenadante foram armazenados em frascos de vidro mantidos a -18°C. Após esta amostragem, mensurou-se o pH com potenciômetro digital (Digimed DM21, São Paulo-SP). Por fim, foi adicionada solução de detergente neutro para a determinação da degradação verdadeira da matéria seca (DVMS) e da matéria orgânica (DVMO).

3.2.3 Descrição do substrato

A dieta de 80:20 concentrado:volumoso continha 62,7% de milho moído, 20% de feno de coastcross, 15,0% de farelo de soja, 1,0% de calcário e 1,3% de mistura mineral (% da MS da dieta). A MS da dieta total foi 90,7%, sendo a composição química (% da MS total): 15,7% de proteína bruta (PB), 3,3% de extrato etéreo (EE), 5,57% de cinzas, 20,3% de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e 8,8% de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA). A dieta foi formulada pelo Small Ruminant Nutrition System

v.1.8.0 (CANNAS et al., 2004) de modo a atingir ou exceder as recomendações para carneiros adultos do National Research Council - NRC (2007).

A composição química do feno de Coastcross foi: 92,0% MS, 9,7% PB, 1,3% EE, 7,14% cinzas, 60,2% FDN e 30,6% FDA. Ambos os substratos foram processados em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba-SP) usando peneira de 1 mm.

3.2.4 Preparação do inóculo

Os doadores de inóculo foram seis carneiros Santa Inês (50 kg de peso corporal) canulados no rúmen, mantidos em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). Os carneiros tinham livre acesso à mistura mineral/água e receberam individualmente suplementação diária de 150 g de milho moído, 65 g de farelo de soja e 4,5 g de melaço de cana. Antes da alimentação matinal, as frações líquida e sólida do rúmen foram colhidas em separado e armazenadas em garrafas térmicas e caixas de isopor, respectivamente. A fração líquida foi obtida usando mangueira plástica conectada a seringa de 60 mL. A fração sólida foi retirada com auxílio de pinça. Volumes iguais de ambas as frações foram misturados em liquidificador por 10 segundos, sendo esta mistura filtrada em três camadas de fraldas de algodão e mantida em banho-maria (39°C) sob fluxo contínuo de CO₂.

3.2.5 Análises laboratoriais e cálculos

A produção de gás foi estimada usando equação definida para as condições laboratoriais em questão:

$$V = 7,365 \times p \quad (n = 500; \text{dados não publicados}) \quad (1)$$

Onde: V = volume de gás (mL); p = pressão mensurada (psi). A produção total de gás foi considerada como a soma das produções parciais de cada leitura.

Para a determinação da DVMO, 70 mL de solução detergente neutro (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) foram adicionados em cada frasco ao término da

incubação, sem α -amilase e sulfito de sódio. Os frascos foram incubados em estufa a 105°C por 3 h, sendo o resíduo filtrado em cadinho, lavado com água quente/acetona e seco a 105°C por 16 h. Por fim, os cadinhos foram postos em mufla a 550°C por 4 h.

A concentração de CH₄ foi determinada injetando-se 1,0 mL de gás em cromatógrafo gasoso Shimadzu 2014 (Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (diâmetro externo de 1,5875 mm, diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 1 m; n° 19809, Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, injetor e detector por ionização de chama foram 60, 200 e 240°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio (10 mL/min). A concentração de CH₄ foi determinada por calibração externa com curva analítica (0, 3, 6, 9, 12%) feita com CH₄ puro (White Martins PRAXAIR Gases Industriais Inc., Osasco-SP; 99,5% pureza). O CH₄ produzido foi calculado de acordo com Longo et al. (2006):

$$\text{CH}_4, \text{ mL} = (\text{gás total, mL} + \text{headspace, 85 ml}) \times \text{CH}_4, \% \quad (2)$$

Para a determinação de AGCC, 1,6 mL de fluido ruminal tamponado foi centrifugado (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA; 15.000 g; 15 minutos; 4°C) com 0,4 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro-RJ) com ácido fórmico 98-100% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; COTTYN; BOUCQUE, 1968; FILÍPEK; DVORAK, 2009) + 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno; PM = 116,16; CAS 88-09-5; Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha). Após a centrifugação, aproximadamente 1,2 mL foi transferido para o *vial* cromatográfico.

As concentrações dos AGCC foram determinadas seguindo as condições cromatográficas do fabricante (HEWLETT PACKARD, 1998) com algumas modificações. Injetou-se 1 µL de amostra em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25 m; 0,320 mm; 0,50 µm; J&W Agilent Technologies Inc.; Palo Alto, CA, EUA). Para a injeção automática foi usada razão de divisão de 20:1 com fluxo de H₂ de 31,35 mL/min (9,20 psi). *Liner* de vidro contendo lã-de-vidro foi utilizado no injetor para evitar a contaminação da coluna. O injetor e o detector por

ionização de chama foram mantidos a 260°C. A rampa de aquecimento do forno foi: 80°C (1 min), 120°C (20°C/min; 3 min), 205°C (10°C/min; 2 min), sendo 16,5 min o tempo total da corrida. O hidrogênio a 1,35 mL/min foi usado como gás de arraste. No detector, os fluxos de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio (*make up*) foram mantidos a 40, 400 e 40 mL/min, respectivamente.

A curva de calibração externa foi feita com padrões cromatográficos (Chem Service, West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6), isovalérico (99%; CAS 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4). A solução-padrão de maior concentração (denominada “super-alta”) continha 200 mM de ác. acético, 54 mM de ác. propiônico, 6 mM de ác. isobutírico, 45 mM de ác. butírico, 9 mM de ác. isovalérico e 9 mM de ác. valérico. As soluções-padrão subsequentes foram obtidas diluindo-se a solução “super alta” por 1/2 (“alta”), 1/4 (“média”), 1/8 (“baixa”) e 1/16 (“super-baixa”). Em seguida, para a preparação dos *vials* com soluções-padrão foram adicionadas as mesmas quantidades de solução 3:1 ác. metafosfórico:ác. fórmico + padrão interno usadas no preparo das amostras.

As determinações de MS, cinzas, PB (analisador de N por combustão Leco FP528; Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA) e EE dos substratos foram realizadas de acordo com a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2006). As concentrações de FDN e FDA foram corrigidas para cinzas. A FDN dos substratos foi determinada pelo método não-sequencial usando α -amilase (Ankom Technology, Tecnoglobo Equipamentos, Curitiba-PR) e sulfito de sódio (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) e a FDA conforme Goering e Van Soest (1970).

3.2.6 Análise estatística

Os dados de cada ensaio foram analisados pelo Proc MIXED do SAS (2004). Os fatores do modelo foram tratamento como efeito fixo e bloco (incubação) como efeito aleatório. As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. As diferenças foram consideradas significativas utilizando o teste de Dunnett a $P < 0,05$. Tendências foram

consideradas a $P < 0,10$. O teste de Dunnett é específico para quando apenas um tratamento (controle) serve como referência (SAMPAIO, 1998).

3.3 Resultados e discussão

Incubação de forragem. Os efeitos do etanol na fermentação de forragem são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeitos do etanol em 24 h de fermentação *in vitro* do feno de Coastcross

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³
	CTL	Et10	Et100	Et1000	
Gás, mL	108,5	110,8 [†]	113,6*	113,1*	2,52
CH ₄ , mL	14,6	14,3	14,4	19,1	2,64
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	13,4	12,9	12,6	16,8	2,32
DVMS, %	42,6	43,9	42,8	37,0*	0,90
DVMO, %	40,9	42,6	41,2	35,1*	0,77
AGCC, mM					
Total	69,6	73,4	74,4 [†]	76,9*	1,60
Acetato	49,0	52,2	53,6*	56,3*	1,39
Propionato	10,7	11,2	10,9	10,7	0,51
Isobutirato	0,65	0,66	0,63	0,63	0,034
Butirato	7,3	7,3	7,4	7,4	0,43
Isovalerato	1,232	1,235	1,178 [†]	1,184	0,0879
Valerato	0,71	0,76	0,70	0,66	0,042
C ₂ :C ₃	4,62	4,71	4,99*	5,32*	0,335
pH	6,81	6,80	6,78	6,80	0,030

¹DVMS = degradação verdadeira da matéria seca; DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; Et10, Et100, Et1000 = CTL + 10, 100 ou 1000 µL de etanol, correspondendo 0,13; 1,3 e 13,3 µL/mL, respectivamente.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Etanol pode ser tanto produzido como consumido durante a fermentação ruminal, sendo intermediário relativamente pouco importante sob condições normais de rúmen (HUNGATE, 1966; RUSSELL, 2002). A produção de etanol é relevante somente sob condições de alta pressão parcial de hidrogênio, momento em que os microrganismos ruminais começam a produzir etanol para drenar H^+ (KRISTENSEN et al., 2007).

Em relação ao consumo de etanol, não existe sua completa oxidação no ambiente ruminal. Utilizando C^{14} , toda a atividade radioativa foi recuperada na fase líquida, sem presença de C^{14} na fase gasosa. Isto indica que não há troca de carbono entre o etanol e o CO_2 ou CH_4 (CZERKAWSKI; BREKENRIDGE, 1972; DURIX et al., 1991). Consequentemente, não há produção de gases pela oxidação de etanol.

A Tabela 1 demonstra que Et100 e Et1000 apresentaram maior ($P < 0,05$) produção de gás em relação ao CTL, com tendência ($P < 0,10$) de aumento para Et10. Como a degradação de etanol no rúmen não leva à produção de gás, concluímos que o gás (CO_2) foi produzido pelo tamponamento do meio ($H^+ + HCO_3^- \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow CO_2 + H_2O$). O tratamento Et1000 apresentou menor ($P < 0,05$) DVMS e DVMO em relação ao CTL, comprovando que a maior produção de gás foi devido ao tamponamento do meio.

Em relação ao CTL, houve maior ($P < 0,05$) produção de acetato em Et100 e Et1000. Ao se adicionar 10 μL de etanol não houve efeito sobre a produção de acetato. Maior ($P < 0,05$) produção total de AGCC foi obtida em Et1000, com tendência ($P < 0,10$) de aumento para Et100. A maior ($P < 0,05$) concentração total de AGCC e a maior relação $C_2:C_3$ ($P < 0,05$) em Et1000 foi devido ao aumento na produção de acetato. Da mesma forma, Et100 também apresentou maior ($P < 0,05$) $C_2:C_3$. Observa-se, portanto, que o acúmulo de AGCC levou ao maior tamponamento do meio e, consequentemente, maior produção de gás.

Pela técnica de C^{14} , Moomaw e Hungate (1963) verificaram que o carbono marcado do etanol foi identificado no acetato, propionato e butirato, sendo acetato o mais importante deles. Durix et al. (1991) observaram que entre 77 e 80% da atividade do C^{14} foi recuperada no acetato, sendo o restante encontrado no butirato, caproato e valerato. *In vivo*, o fornecimento de etanol também levou à formação de acetato, isovalerato e valerato (EMERY et al., 1959; ORSKOV; HEMKEN; MOORE, 1967).

Assim, o aumento da concentração de acetato em Et1000 é explicado pela metabolização do etanol.

A etapa intermediária da produção de acetato pelo consumo de etanol é a formação de acetil-CoA (YOSHII; ASANUMA; HINO, 2005). Segundo Orskov, Hemken e Moore (1967), etanol serve como doador de acetil-CoA para a formação dos ácidos butírico, valérico e capróico. Assim, a formação dos ácidos de 4 e 5 C ocorre por reação de condensação com o acetil-CoA oriundo do metabolismo de etanol. Ácido butírico é formado pela condensação de dois acetil-CoA, ácido valérico pela de acetil-CoA + propionil-CoA, enquanto ácido capróico pela condensação de acetil-CoA + butiril-CoA (RUSSELL, 2002). Em cultura pura de *Clostridium kluyveri*, foi demonstrado que o fornecimento de etanol e ácido acético (doadores de acetil-CoA) levou à produção dos ácidos butírico e capróico. Em contrapartida, houve produção de ácido valérico ao se fornecer somente etanol (doador de acetil-CoA) e ácido propiônico (doador de propionil-CoA; BORNSTEIN; BAKER, 1948). Em nosso experimento, não houve efeito sobre a concentração de butirato, isobutirato e valerato. Somente Et100 apresentou tendência ($P < 0,10$) de diminuição de isovalerato.

O etanol também não alterou a concentração de propionato. Alguns estudos observaram diminuição na proporção molar de propionato (PRADHAN; HEMKEN, 1970; DURIX et al., 1991), o que foi resultado direto da maior concentração de acetato. Como nossos dados foram expressos em concentração, não houve efeito de etanol sobre propionato. Mesmo sendo comprovado o aparecimento de C^{14} do etanol no propionato (MOOMAW; HUNGATE, 1963; DURIX et al., 1991), o fato é que a produção de propionato a partir de etanol é praticamente insignificante. A presença de radioatividade no propionato advém do fato de pequenas quantidades de acetil-CoA serem recicladas pelo ciclo do ácido cítrico e, assim, incorporadas no propionato pela via metabólica do succinato (DURIX et al., 1991).

Não foram observadas diferenças na produção de CH_4 (mL) ou na relação CH_4 :Gás. No rúmen, etanol é oxidado até acetato, ocorrendo transferência interespecífica de hidrogênio para as *Archaea* e, portanto, redução de CO_2 em CH_4 ($2 C_3-CH_2OH + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2 CH_3-COOH$; DURIX et al., 1991). Em cultura pura, a incubação de *Ruminococcus albus* ou *Ruminococcus flavefaciens* + microrganismos

metanogênicos + etanol resultou em consumo de etanol e produção de CH₄ (HINO et al., 1992). Em fermentação *in vitro*, a adição de 1,985 µL/mL (34 mM) de etanol aumentou em 48% a produção de CH₄ (YOSHII; ASANUMA; HINO, 2005).

A possível explicação para a ausência de efeito do etanol na produção de CH₄ de nosso experimento é o elevado erro padrão da média, bem acima do normalmente observado em nossas condições experimentais. DURIX et al. (1991) também não encontraram diferença significativa na relação CO₂:CH₄ com a adição de etanol, explicando que as produções de gás e CH₄ apresentaram grande variação entre os dias experimentais. Todavia, para Et1000 observou-se aumento numérico na produção de CH₄, mesmo com queda ($P < 0,05$) na DVMS e DVMO.

Etanol é lentamente consumido pelos microrganismos ruminais (MOOMAW; HUNGATE, 1963). *In vivo*, por exemplo, não há completa metabolização ruminal de etanol, sendo parcial a sua conversão em AGCC (DURIX et al., 1991). Grande parte do desaparecimento de etanol no rúmen ocorre por absorção pela parede ruminal (EMERY et al., 1959; KRISTENSEN et al., 2007), sendo levado ao fígado e convertido em acetaldeído e posteriormente em acetato (RANDBY; SELMER-OLSEN; BAEVER, 1999). Documentou-se que em 24 h de incubação *in vitro* foram consumidos somente 39% do 1,985 µL/mL (34 mM) de etanol adicionado (YOSHII; ASANUMA; HINO, 2005). Portanto, é importante considerarmos que o etanol pode não ter sido totalmente metabolizado em nossas condições, principalmente em Et100 (1,3 µL/mL) e Et1000 (13,3 µL/mL). A conversão *in vitro* do etanol em acetato é intimamente regulada pela pressão parcial de H₂ (DURIX et al., 1991). Experimentos com culturas puras demonstraram que, à medida que há aumento na pressão parcial de H₂, são várias as bactérias ruminais incapazes de transformar o acetil-CoA (oriundo da degradação de substrato) em acetato e etanol (THAUER; KRÖGER, 1983). Durix et al. (1991) discutiram que é provável que o metabolismo das bactérias utilizadoras de etanol seja regulado da mesma maneira. Logo, é coerente admitirmos que a adição de etanol causou aumento de pressão de H₂ capaz de impedir sua completa metabolização. Infelizmente não mensuramos a concentração de etanol ao final da incubação.

Incubação da dieta de alto concentrado. Os efeitos do etanol na fermentação da dieta de alto concentrado são apresentados na Tabela 2. Não houve efeito sobre a

produção de gás, produção de CH₄ e relação CH₄:Gás. De acordo com Czerkawski e Brekenridge (1972), o metabolismo de etanol não acarreta em produção de gás.

A DVMS também não foi afetada pela adição de etanol, sendo que Et1000 apresentou tendência ($P < 0,10$) de redução na DVMO. Emery et al. (1959) verificaram tendência de redução na digestibilidade *in vivo* da MO pelo uso de etanol. Em sistema RUSITEC, a adição de etanol (1, 4 e 8 g/d) não alterou a digestibilidade da MO, FDN e FDA, porém reduziu a digestibilidade do N ao se fermentar uma dieta de baixo valor nutritivo (DURIX et al., 1991).

Tabela 2 – Efeitos do etanol em 16 h de fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³
	CTL	Et10	Et100	Et1000	
Gás, mL	124,0	120,1	123,1	124,2	2,65
CH ₄ , mL	19,5	15,8	18,2	20,3	3,27
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	15,7	13,1	14,6	16,1	2,44
DVMS, %	69,7	69,4	68,9	65,9	2,36
DVMO, %	69,1	69,1	68,6	65,3 [†]	2,32
AGCC, mM					
Total	73,9	77,2	83,3*	78,9	3,11
Acetato	47,4	49,7	55,0*	52,4	2,05
Propionato	13,1	13,7	14,1	12,9	0,48
Isobutirato	0,75	0,78	0,79	0,74	0,05
Butirato	10,4	10,7	11,2	10,7	0,54
Isovalerato	1,36	1,39	1,39	1,30	0,097
Valerato	0,86	0,93 [†]	0,90	0,78*	0,039
C ₂ :C ₃	3,61	3,63	3,91*	4,07*	0,055
pH	6,73	6,74	6,66	6,70	0,042

¹DVMS = degradação verdadeira da matéria seca; DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; Et10, Et100, Et1000 = CTL + 10, 100 ou 1000 µL de etanol, correspondendo 0,13; 1,3 e 13,3 µL/mL, respectivamente.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

As concentrações de AGCC totais e acetato foram maiores ($P < 0,05$) que o CTL somente para Et100. Em sistema RUSITEC, a adição de etanol (1, 4 e 8 g/d) aumentou a concentração de AGCC totais, também com elevação na concentração de acetato (DURIX et al., 1991).

Todos os outros AGCC não foram influenciados pelo etanol. A única exceção foi valerato, que apresentou redução ($P < 0,05$) em Et1000 e tendência de aumento ($P < 0,10$) para Et10. Como explicado anteriormente, o metabolismo de etanol no rúmen leva à produção de valerato (DURIX et al., 1991). Da mesma forma, a diminuição na concentração de valerato em Et1000 provavelmente está relacionada à tendência de queda na DVMO.

A relação $C_2:C_3$ foi maior ($P < 0,05$) para Et100 e Et1000 em comparação ao CTL. Mesmo sem diferença estatística, o aumento numérico de acetato em Et1000 resultou em aumento ($P < 0,05$) da relação $C_2:C_3$. Maior produção de acetato e elevação de $C_2:C_3$ também foram observadas ao se adicionar etanol em sistema RUSITEC (DURIX et al., 1991).

De modo diferente ao verificado na fermentação de forragem, a maior concentração de acetato em Et100 não resultou em aumento de produção de gás. Adicionalmente, Et100 também não apresentou queda na DVMS e DVMO, o que ajudaria a explicar este fato. Portanto, deveríamos esperar aumento de produção de gás causado pelo tamponamento do meio. O bicarbonato de sódio e bicarbonato de amônio são as substâncias tamponantes usadas em nosso meio de incubação (PRESTON, 1995), que possui pH de 6,80. É possível observar que o pH ao final das 16 h de incubação encontrava-se próximo de 6,70, o que possivelmente indica o esgotamento do sistema tamponante. Assim, maior produção de ácido não acarretaria em produção adicional de CO_2 .

Comentários sobre óleos essenciais e metabolismo do etanol. Neste trabalho comprovamos pesquisas anteriores, demonstrando que o etanol afetou a fermentação ruminal *in vitro*, tanto de forragem como de dieta de alto concentrado.

As técnicas *in vitro* utilizadas nas pesquisas com óleos essenciais/monensina sempre empregam baixos volumes de fluido ruminal tamponado (mistura de meio de incubação e fluido ruminal). Como exemplos, pesquisadores utilizaram volumes de 19,3

mL (BENCHAAAR et al., 2007), 40 mL (MACHEBOEUF et al., 2008), 50 mL (BUSQUET et al., 2005; CASTILLEJOS et al., 2008; KAMEL et al., 2008) e 75 mL (SELJE-ASSMANN; HOFFMANN; BECKER, 2008). Adicionalmente, óleos essenciais são fornecidos em baixas concentrações, seja por apresentarem elevado efeito biológico ou, por muitas vezes, serem utilizados na forma de compostos purificados. Como exemplo, Kamel et al. (2008) trabalharam com doses de alicina de 0,5; 5 e 10 mg/L. Trabalhando com diversos óleos essenciais, Cardozo et al. (2005) utilizaram doses de 0,3; 3 e 30 mg/L, Castillejos et al. (2008) doses de 5, 50 e 500 mg/L e Busquet et al. (2006) doses de 3, 30, 300 e 3000 mg/L.

Devido a estes dois fatores, o volume de óleo essencial a ser aplicado por frasco de incubação é sempre muito baixo. Isto frequentemente inviabiliza a pipetagem, já que os óleos se apresentam sob forma líquida. Logo, é comum o emprego de etanol como solvente. A diluição do óleo essencial em etanol permite que o volume aplicado por frasco seja grande o suficiente para permitir sua pipetagem.

Várias pesquisas com óleos essenciais também incluem etanol nos frascos controle (BUSQUET et al., 2005, 2006; CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006; CASTILLEJOS, 2008; MARTÍNEZ et al., 2006; BENCHAAAR et al., 2007; GARCÍA et al., 2007; CHAVES et al., 2008; MACHEBOEUF et al., 2008; KAMEL et al., 2008). Tal prática é utilizada para que o efeito do etanol seja uniformemente distribuído entre todos os tratamentos, o que não interferiria nos efeitos dos óleos essenciais.

Todavia, desconhecemos a existência de informações sobre as interações entre óleos essenciais/etanol, da mesma forma que a interação monensina/etanol. Monensina e óleos essenciais alteram as populações microbianas, o padrão de produção de AGCC, assim como a produção de hidrogênio ruminal. É muito provável que haja interação entre os efeitos dos óleos essenciais/monensina e o metabolismo do etanol no rúmen. Sendo isto verdade, a introdução de etanol no controle negativo não anularia seu efeito sobre a fermentação. Para sustentar essa hipótese, Durix et al. (1991) discutiram que seria muito interessante estudar os efeitos da monensina sobre o metabolismo do etanol, sugerindo assim a possibilidade de interação entre as duas substâncias.

Da mesma forma, óleos essenciais são substâncias hidrofóbicas. O uso de etanol poderia, de certa maneira, potencializar a interação dos mesmos com a fase aquosa do meio de incubação. Isto, provavelmente, maximizaria a ação dos óleos. Em condições *in vivo*, óleos essenciais são administrados de modo distinto. São, em geral, fornecidos misturados à dieta, sob forma sólida associados a uma matriz lipídica.

3.4 Conclusão

Ao se incubar feno ou dieta de alto concentrado, as adições de 100 (1,3 µL/mL) e 1000 µL (13,3 µL/mL) de etanol causaram alterações na fermentação ruminal *in vitro*. Houve, principalmente, elevação nas concentrações de AGCC e acetato juntamente com aumento da relação C₂:C₃. A adição de 10 µL praticamente não alterou a fermentação, exceto pela tendência de aumento na concentração de gás ao se incubar feno e tendência de aumento de valerato ao se incubar dieta de alto concentrado.

O uso de etanol na veiculação *in vitro* de óleos essenciais/monensina deve ser encarado com cautela. Caso seja inevitável, sugerimos a utilização da menor dose possível, que em nossas condições correspondeu a 10 µL (0,13 µL/mL). Sugerimos que experimentos sejam conduzidos para avaliar as possíveis interações entre os efeitos de etanol e óleos essenciais/monensina sobre a fermentação ruminal.

Referências

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Gaithersburg, 2006.

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.

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

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V.; FRASER, G.R.; COLOMBATTO, D.; McALLISTER, T.A.; BEAUCHEMIN, K.A. A review of plant-derived essential oils in

ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 209-228, 2008.

BORNSTEIN, B.T.; BARKER, H.A. The energy metabolism of *Clostridium kluyveri* and the synthesis of fatty acids. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 172, n. 2, p. 659, 1948.

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

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; 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, 2005.

CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.

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

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

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

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

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

COTTYN, B.G.; BOUCQUE, C.V. Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 16, n. 1, p. 105-107, 1968.

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 27, n. 1, 131-146, 1972.

DURIX, A.; JEAN-BLAIN, C.; SALLMANN, H.P.; JOUANY, J.P. Use of semicontinuous culture system (RUSITEC) to study the metabolism of ethanol in the rumen and its effects on ruminal digestion. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 71, n. 1, p. 115-123, 1991.

EMERY, R.S.; LEWIS, T.R.; EVERETT JR., J.P.; LASSITER, C.A. Effect of ethanol on rumen fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 7, p. 1182-1186, 1959.

FILÍPEK, J.; DVORAK, R. Determination of the volatile fatty acid content in the rumen liquid: comparison of gas chromatography and capillary isotachopheresis. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 78, n. 4, p. 627-633, 2009.

GARCÍA, V.; CATALÁ-GREGORI, P.; MADRID, J.; HERNÁNDEZ, F.; MEGÍAS, M.D.; ANDRADE-MONTEMAYOR, H.M. Potential of carvacrol to modify *in vitro* rumen fermentation as compared with monensin. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 5, p. 675-680, 2007.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington: USDA, ARS, 2007. (Agriculture Handbook, 379).

HEWLETT PACKARD. **The separation of saturated and unsaturated acids and FAMES using HP-FFAP and HP-INNOWax columns**. Application note 228-398. 1998. Disponível em: <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59663971.pdf>. Acesso em: 38 jul. 2010.

HINO, T.; MUKUNOKI, H.; IMANISHI, K.; MIYAZAKI, K. Necessity of ready electron disposal and interspecies hydrogen transfer for the utilization of ethanol by rumen bacteria. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Suweon, v. 5, n. 3, p. 511-517, 1992.

HUNGATE, R.E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 1966. 533 p.

KAMEL, C.; GREATHEAD, H.M.R.; TEJIDO, M.L.; RANILLA, M.J.; CARRO, M.D. Effects of allicin and diallyl disulfide on *in vitro* fermentation of mixed diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 351-363, 2008.

KRISTENSEN, N.B.; STORM, A.; RAUN, B.M.L.; RØJEN, B.A.; HARMON, D.L. Metabolism of silage alcohols in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 1364-1377, 2007.

LONGO, C.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; GODOY, P.B.; CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

MACHEBOEUF, D.; MORGAVI, D.P.; PAPON, Y.; MOUSSET, J. -L.; ARTURO-SCHAAN, M. Dose-response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 335-350, 2008.

MAKKAR, H.P.S. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: FAO. **FAO animal production and health 160: assessing quality and safety of animal feeds**. Rome, 2004. chap. 3, p. 55-88. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5159e/y5159e00.pdf>>. Acesso em: 22 sep. 2010.

MARTÍNEZ, S.; MADRID, J.; HERNÁNDEZ, F.; MEGÍAS, M.D.; SOTOMAYOR, J.A.; JORDÁN, M.J. Effect of thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 18, p. 6598-6602, 2006.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

MOOMAW, C.R.; HUNGATE, R.E. Ethanol conversion in the bovine rumen. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 85, n. 3, p. 721-722, 1963.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academic Press, 2007. 292 p.

ORSKOV, E.R.; HEMKEN, R.W.; MOORE, L.A. Effect of ethanol infusion on milk fat content and composition and on volatile fatty acids in the rumen liquor. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 50, n. 5, p. 692-695, 1967.

PRADHAN, K.; HEMKEN, R.W. Utilization of ethanol and its effect on fatty acid patterns in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, n. 12, p. 1739-1746, 1970.

PRESTON, T.R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. 305 p. (Animal Production and Health Paper, 126). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/v9327e/v9327e00.HTM>>. Acesso em: 25 jul. 2010.

RANDBY, A.T.; SELMER-OLSEN, I.; BAEVRE, L. Effect of ethanol in feed on milk flavor and chemical composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 2, p. 420-428, 1999.

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

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

SAS INSTITUTE. **SAS systems for Windows PC**: versão 9.1.3. Cary, 2004.

SELJE-ASSMANN, N.; HOFFMANN, E.M.; BECKER, K. A batch incubation assay to screen plant samples and extracts for their ability to inhibit rumen protein degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 302-318, 2008.

THAUER, R.K.; KRÖGER, A. Energy metabolism of two rumen bacteria with special reference to growth efficiency. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HERBIVORE NUTRITION IN THE SUBTROPICS AND TROPICS, 1983, Pretoria. **Herbivore nutrition in subtropics and tropics**. Pretoria, 1983.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3/4, p. 185-197, 1994.

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

YOSHII, T.; ASANUMA, N.; HINO, T. Effect of ethanol on nitrate and nitrite reduction and methanogenesis in the ruminal microbiota. **Animal Science Journal**, London, v. 76, n. 1, p. 37-42, 2005.

4 O USO DE BRANCOS NA DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DAS PRODUÇÕES LÍQUIDAS DE GÁS E METANO AO SE UTILIZAR MODIFICADORES DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

Resumo

Brancos (garrafas de incubação ausentes de substrato, contendo somente inóculo ruminal e meio de incubação) são utilizados para se descontar o gás, o metano (CH₄) e a matéria orgânica (MO) residual resultantes da fermentação *in vitro* da MO oriunda do inóculo. Todavia, a inclusão de modificadores ruminais pode afetar a fermentação da MO tanto do substrato como do inóculo. Logo, podem existir erros ao se corrigir os dados de produção de gás, CH₄ e degradabilidade *in vitro* utilizando-se brancos ausentes de modificador ruminal. O objetivo deste estudo foi avaliar o uso de brancos contendo aditivo (brancos específicos) ou brancos sem aditivo na estimativa das produções líquidas de gás e CH₄. Nós utilizamos a técnica *in vitro* semiautomática de produção de gás incluindo-se monensina (2,08 mg/L; Experimento 1) ou carvacrol, eugenol e 1,8-cineol (667 mg/L; Experimento 2) em frascos contendo substrato ou em brancos. Em 16 h de fermentação, a monensina reduziu ($P \leq 0.02$) a produção de gás nos frascos contendo substrato (162,0 vs 146,3 mL) assim como nos brancos (84,4 vs 79,2 mL). A produção de CH₄ diminuiu ($P \leq 0,05$) ao se adicionar monensina nos frascos contendo substrato (15,7 vs 11,9 mL) e nos brancos (6,4 vs 5,0 mL). As inclusões de carvacrol e eugenol reduziram ($P \leq 0,05$) as produções de gás e CH₄ nos frascos com e sem substrato, sendo o efeito mais pronunciado do que o observado para monensina. Para estes três aditivos, a correção usando brancos sem aditivo resultou em menor produção de gás e CH₄ do que a correção usando os brancos específicos. Por exemplo, a correção dos dados de carvacrol usando o branco sem este aditivo resultou em produções negativas de gás e CH₄ (-6,5 e -1,5 mL, respectivamente). Estes valores não-biológicos ocorreram pois as produções de gás e CH₄ no branco sem carvacrol (46,1 e 2,1 mL, respectivamente) foram maiores do que no frasco contendo substrato + carvacrol (39,7 e 0,6 mL, respectivamente). Neste trabalho, nós demonstramos que a inclusão de aditivos ruminais afetou a fermentação da MO tanto do substrato como do inóculo. Desta forma, a correção das produções de gás e CH₄ usando brancos sem aditivos superestimou o efeito dos mesmos. Nós sugerimos que brancos contendo os aditivos de interesse (brancos específicos) sejam utilizados quando modificadores de fermentação ruminal forem avaliados *in vitro*.

Palavras-chave: Carvacrol; 1,8-cineol; Eugenol; Monensina; Óleos essenciais; Produção de gás *in vitro*

Abstract

Blanks (flasks without substrate, containing only inoculum and medium) are used *in vitro* to correct for gas, methane (CH₄), and the amount of residual organic matter (OM) resulting from fermentation of OM in the inoculum. However, inclusion of rumen

fermentation modifiers may affect fermentation of OM in the substrate and inoculum. Thus, data correction using blanks that lack additives may result in inaccurate adjustment for background fermentation. The objective of this study was to evaluate impacts of using blanks containing additive (*i.e.* specific blanks) or blanks without additive on estimation of *in vitro* net gas and CH₄ production. We used the semi automated *in vitro* gas production technique including monensin sodium (2.08 mg/L; Experiment 1) or carvacrol, eugenol, and 1,8-cineol (667 mg/L; Experiment 2) in flasks with substrate and in blank flasks. At 16 h of incubation, monensin reduced ($P \leq 0.02$) total gas production in flasks containing substrate (162.0 *versus* 146.3 mL) and in blanks (84.4 *versus* 79.2 mL). Methane production was also decreased ($P \leq 0.05$) by adding monensin to flasks containing substrate (15.7 *versus* 11.9 mL) as well as in blanks (6.4 *versus* 5.0 mL). Inclusion of carvacrol or eugenol reduced ($P \leq 0.05$) gas and CH₄ production in flasks with substrate and in blanks, but in a more pronounced manner than monensin. For these three additives, correction for blank without additive resulted in lower gas and CH₄ production than correction for a treatment specific blank. For instance, correcting carvacrol data using blank without this additive resulted in negative net gas and CH₄ production (-6.5 and -1.5 mL, respectively). These biologically impossible results occurred because gas and CH₄ production in blank without carvacrol (46.1 and 2.1 mL, respectively) were higher than in flasks containing substrate plus carvacrol (39.7 and 0.6 mL, respectively). Here we demonstrated that inclusion of rumen additives affected fermentation of OM in the substrate and in the inoculum. Thus, correction of gas and CH₄ production using blanks without additives resulted in an overestimation of these variables. Blanks that include the additive of interest should be used when rumen fermentation modifiers are evaluated *in vitro*.

Keywords: Carvacrol; 1,8-cineol; Essential oils; Eugenol; *In vitro* gas production; Monensin

4.1 Introdução

Técnicas de produção de gás *in vitro* são amplamente utilizadas na avaliação do potencial antimetanogênico de modificadores de fermentação ruminal, como exemplo os compostos secundários de plantas (BODAS et al., 2008; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008; SOLIVA et al., 2008). Há diversas maneiras de se expressar a produção *in vitro* de metano (CH₄), como mL (ou mmol) de CH₄ por g de substrato incubado (PATRA; KAMRA; AGARWAL, 2006; BODAS et al., 2008), mL (ou mmol) de CH₄ por g de substrato degradado (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008; AGARWAL et al., 2009) e mL de CH₄ por mL de gás produzido (GOEL; MAKKAR; BECKER, 2008; SOLIVA et al., 2008).

Modificadores de fermentação ruminal (ex: ionóforos e óleos essenciais) apresentam efeito dose-dependente sobre a degradação *in vitro* (RUSSELL; STROBEL, 1988; BENCHAAAR et al., 2008). Assim, a produção *in vitro* de CH₄ expressa por unidade de substrato degradado é mais conveniente do que a expressa por unidade de substrato incubado.

Excluindo o CO₂ indiretamente liberado pelo tampão, o gás e o CH₄ são produzidos pela fermentação *in vitro* da matéria orgânica (MO) do substrato e do inóculo ruminal (GETACHEW et al., 1998). Logo, para calcular o volume de CH₄ produzido por unidade de MO degradada, são necessários os valores líquidos de gás, CH₄ e MO degradada. Consequentemente, brancos (frascos sem substrato, contendo somente inóculo ruminal e meio de incubação) são usados para se obter os valores de gás, CH₄ e MO residual oriundos da fermentação da MO do inóculo (RYMER et al., 2005).

Estudos prévios usaram brancos sem aditivo (PATRA; KAMRA; AGARWAL, 2006; BODAS et al., 2008), brancos com aditivo (ALEXANDER et al., 2008; GOEL; MAKKAR; BECKER, 2008), enquanto outros não informaram a utilização de brancos (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2008; SOLIVA et al., 2008; AGARWAL et al., 2009). Tanto a fermentação da MO do substrato como do inóculo podem ser afetadas pela inclusão de modificadores de fermentação ruminal. Portanto, corrigir as produções de gás e CH₄, assim como a degradação *in vitro* da MO, usando brancos sem aditivo pode resultar em erros.

Por meio da técnica *in vitro* de produção de gás, nosso objetivo foi avaliar os efeitos da monensina sódica e de três compostos secundários de plantas (carvacrol, eugenol e 1,8-cineol) sobre a fermentação ruminal de frascos contendo substrato assim como dos brancos.

4.2 Material e Métodos

O estudo foi conduzido entre dezembro de 2009 e maio de 2010 no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. Dois experimentos foram conduzidos de forma independente. No primeiro, utilizou-se

monensina sódica a 0,156 mg/75 mL de fluido ruminal tamponado (2,08 mg/L). A monensina foi selecionada devido a sua ampla utilização como controle positivo em estudos *in vitro*. A dose acima foi escolhida por promover redução nas produções de gás e CH₄ e aumento na concentração de propionato com mínimo efeito sobre a degradação da MO (ARAUJO et al., 2009). O segundo experimento foi relacionado ao uso de carvacrol, eugenol e 1,8-cineol na dose de 50 mg por 75 mL de fluido ruminal tamponado (667 mg/L). Esta dose foi escolhida para nos assegurar dos efeitos dessas substâncias sobre a fermentação da MO.

4.2.1 Delineamento experimental

Para monensina (Experimento 1) foi utilizado o delineamento em blocos completos ao acaso, sendo a incubação, repetida 10 vezes, considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados em cada incubação. Logo, a média dos três frascos foi considerada a repetição. Os tratamentos foram: Branco Controle (**B_{CTL}**) – frasco sem substrato, contendo somente inóculo + meio de incubação; Branco Monensina (**B_{MON}**) – B_{CTL} + 0,156 mg de monensina; Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Monensina (**MON**) – CTL + 0,156 mg de monensina.

A solução-estoque de monensina pura (M5273 – Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO; PM = 692,85) foi preparada diluindo-se 15,6 mg em 1,0 mL de etanol puro e preservada a -10°C. Foram adicionados 10 µL de solução-estoque em cada frasco (50 mL de meio de incubação + 25 mL de fluido ruminal) momentos antes da inoculação. Assim, atingiu-se a concentração final de 0,156 mg/75 mL de fluido ruminal tamponado (2,08 mg/L). De acordo com Selje-Assmann, Hoffmann e Becker (2008), 11,25 µL de etanol em 75 mL de fluido ruminal tamponado não possuíram efeitos mensuráveis sobre a fermentação *in vitro*. Portanto, etanol não foi adicionado nos tratamentos restantes.

No estudo sobre compostos secundários de plantas (Experimento 2) foi utilizado o delineamento de blocos completos ao acaso, sendo a incubação, repetida três vezes, considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados por incubação, sendo a média dos três frascos considerada a repetição. Os tratamentos foram: Branco

Controle (**B_{CTL}**) – frasco sem substrato, contendo somente inóculo + meio de incubação; Branco Carvacrol (**B_{CARV}**) – B_{CTL} + 50 mg de carvacrol; Branco Eugenol (**B_{EUG}**) – B_{CTL} + 50 mg de eugenol; Branco 1,8-Cineol (**B_{CIN}**) – B_{CTL} + 50 mg de 1,8-cineol; Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Carvacrol (**CARV**) – CTL + 50 mg de carvacrol; Eugenol (**EUG**) – CTL + 50 mg de eugenol; 1,8-Cineol (**CIN**) – CTL + 50 mg de 1,8-cineol.

A concentração final de todos os compostos secundários foi 667 mg/L de fluido ruminal tamponado. Carvacrol (2-metil-5-isopropil-1-fenol), eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil)-fenol) e 1,8-cineol (1,3,3-trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano) foram fornecidos como compostos puros pela GRASP Ind. e Com. Ltda (Curitiba-PR). Os produtos foram veiculados diretamente, sem uso de etanol.

4.2.2 Condições de incubação

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) usando transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba-SP). Os frascos de vidro (volume total = 160 mL; *head space* = 85 mL) foram sequencialmente abastecidos com 500 mg de substrato seco ao ar, 50 mL de meio de incubação (meio de Theodorou descrito em PRESTON, 1995) e 25 mL de inóculo. Em seguida, os frascos foram selados com tampas de borracha (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, EUA), agitados manualmente e incubados em estufa de ventilação forçada (Marconi MA35, Piracicaba-SP) a 39°C por 16 h. A pressão interna do frasco foi mensurada às 3, 6, 11 e 16 h após incubação. Em cada leitura, 2,5 mL de gás foram armazenados em tubos a vácuo de 10 mL. Para a colheita de gás foram usadas seringas de 5 mL (Becton Dickson Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba-PR). Após cada amostragem, a pressão interna dos frascos foi aliviada, sendo eles agitados manualmente e recolocados na estufa. Após 16 h, os frascos foram imersos em água gelada (4°C), sendo adicionada solução de detergente neutro para a determinação da degradação verdadeira da MO (DVMO).

4.2.3 Descrição do substrato

O substrato incubado foi dieta 80% concentrado e 20% volumoso, contendo 62,7% de milho moído, 20% de feno de coastcross, 15,0% de farelo de soja, 1,0% de calcário e 1,3% de mistura mineral (% da matéria seca da dieta). A matéria seca (MS) da dieta total foi 91,4%, sendo a composição química (% da MS total): 15,7% de proteína bruta (PB), 3,3% de extrato etéreo (EE), 5,4% de cinzas, 20,3% de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e 8,8% de fibra insolúvel em detergente ácido (FDA). A dieta foi formulada pelo Small Ruminant Nutrition System v.1.8.0 (CANNAS et al., 2004) de modo a atingir ou exceder as recomendações para carneiros adultos do NRC (2007). A dieta foi processada em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba-SP) usando peneira de 1 mm.

4.2.4 Preparação do inóculo

No experimento com monensina, os doadores de inóculo foram três carneiros Santa Inês (50 kg de peso corporal) canulados no rúmen. Os animais permaneceram estabulados e foram alimentados diariamente com 1,2 kg/animal de dieta igual a incubada. O alimento foi fornecido duas vezes ao dia (7 e 17 h) em proporções iguais, com adaptação durando pelo menos 10 dias. Os carneiros tiveram livre acesso à água e mistura mineral. Antes da alimentação matinal, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram colhidas em separado e armazenadas em garrafas térmicas e caixas de isopor, respectivamente. A fração líquida foi obtida usando mangueira plástica conectada a seringa de 60 mL. A fração sólida foi retirada com auxílio de pinça. Volumes iguais de ambas as frações foram misturados em liquidificador por 10 segundos, sendo esta mistura filtrada em três camadas de fraldas de algodão e mantida em banho-maria (39°C) sob fluxo contínuo de CO₂. O inóculo final foi a mistura dos inóculos individuais dos três carneiros.

Para o experimento de compostos secundários, os mesmos três carneiros foram utilizados, porém agora mantidos em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). Os animais tinham livre acesso à mistura

mineral e água, recebendo individualmente suplementação diária de 150 g de milho moído, 65 g de farelo de soja e 4,5 g de melaço de cana. O inóculo foi preparado seguindo o procedimento descrito anteriormente.

4.2.5 Análises laboratoriais e cálculos

A produção de gás foi estimada usando equação definida para as condições laboratoriais em questão:

$$V = 7,365 \times p \quad (n = 500; \text{dados não publicados}) \quad (1)$$

Onde: V = volume de gás (mL); p = pressão mensurada (psi). A produção total de gás em 16 h foi considerada como a soma das produções parciais de cada leitura. A produção líquida de gás, expressa em mL/g $MO_{\text{degradada}}$, foi calculada corrigindo os valores de produção de gás e DVMO para o branco correspondente.

Ao término da incubação, o resíduo de MO e a DVMO foram determinados adicionando-se 70 mL de solução detergente neutro (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) em cada frasco, sem α -amilase e sulfito de sódio. A seguir, os frascos foram incubados em estufa a 105°C por 3 h, sendo o resíduo filtrado em cadinho, lavado com água quente/acetona e seco a 105°C por 16 h. Por fim, os cadinhos postos em mufla a 550°C por 4 h. A DVMO foi obtida corrigindo-se o valor para o branco correspondente.

A concentração de CH_4 foi determinada injetando-se 1,0 mL de gás em cromatógrafo gasoso Shimadzu 2014 (Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (diâmetro externo de 1,5875 mm, diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 1 m; n° 19809, Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, injetor e detector por ionização de chama foram 60, 200 e 240°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio com fluxo de 10 mL/min. A concentração de CH_4 foi determinada por calibração externa usando curva analítica (0, 3, 6, 9, 12%) preparada com CH_4 puro (White Martins PRAXAIR Gases Industriais Inc.,

Osasco-SP; 99,5% pureza). O CH₄ produzido foi calculado de acordo com Longo et al. (2006):

$$\text{CH}_4, \text{ mL} = (\text{gás total, mL} + \text{headspace, 85 ml}) \times \text{CH}_4, \% \quad (2)$$

A produção líquida de CH₄, expressa em mL/g MO_{degradada}, foi calculada corrigindo os valores de produção de CH₄ e DVMO usando os brancos correspondentes. As determinações de MS, cinzas, PB (analisador de N por combustão Leco FP528; Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA) e EE da dieta foram realizadas conforme a AOAC (2006). A FDN e FDA foram corrigidas para cinzas. A FDN do substrato foi determinada pelo método não-sequencial usando α-amilase (Ankom Technology, Tecnoglobo Equipamentos, Curitiba-PR) e sulfito de sódio (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) e a FDA conforme Goering e Van Soest (1970).

4.2.6 Análise estatística

Os dados do experimento de monensina foram analisados pelo Proc MIXED do SAS 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os fatores do modelo foram: tratamento como efeito fixo e bloco como efeito aleatório. As médias de produção total de gás, produção total de CH₄ e MO residual total foram obtidas pelo comando LSMEANS. As comparações CTL vs. MON e B_{CTL} vs. B_{MON} foram obtidas por análise de contrastes. As estimativas das produções líquidas de gás e CH₄, assim como a MO residual líquida, foram obtidas pelo comando ESTIMATE, subtraindo-se B_{CTL} do CTL e B_{MON} da MON, respectivamente. O contraste “CTL – B_{CTL} vs. MON – B_{CTL}” foi realizado considerando: +CTL –B_{CTL} –MON +B_{CTL}, o que resultou em +CTL –MON. O contraste “CTL – B_{CTL} vs. MON – B_{MON}” foi realizado considerando: +CTL –B_{CTL} –MON +B_{MON}. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Os dados de compostos secundários foram analisados pelo Proc MIXED do SAS 9.1.3 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os fatores do modelo foram: tratamento como efeito fixo e bloco como efeito aleatório. As médias dos tratamentos, as estimativas e os

contrastes foram obtidos assim como descrito para o experimento com monensina. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4.3 Resultados

4.3.1 Experimento 1 – monensina

A monensina reduziu ($P < 0,05$) as produções totais de gás e CH_4 dos frascos contendo substrato e dos brancos (Tabela 3). O tratamento MON apresentou maior ($P < 0,01$) MO residual total do que CTL, enquanto B_{MON} não diferiu ($P = 0,39$) de B_{CTL} .

Tabela 3 – Efeito da monensina em 16 h de fermentação ruminal *in vitro* dos frascos contendo substrato e dos brancos (Experimento 1)

Item	Tratamento ^a				EPM ^b	Contrastes (Valor de P)		
	CTL	MON	B_{CTL}	B_{MON}		EPD ^c	CTL vs MON	B_{CTL} vs B_{MON}
Gás total (ml)	162,0	146,3	84,4	79,2	4,66	2,16	$< 0,01$	0,02
CH_4 total (ml)	15,7	11,9	6,4	5,0	0,82	0,65	$< 0,01$	0,05
MO residual total (mg)	119,3	145,1	31,2	34,5	3,32	3,73	$< 0,01$	0,39

^aCTL e MON: Controle e Monensina, frascos contendo 500 mg de substrato seco ao ar + 50 ml de meio + 25 ml de inóculo + 0,156 mg de monensina ou não; B_{CTL} e B_{MON} : Branco Controle e Branco Monensina, frascos sem substrato contendo 50 ml de meio + 25 ml de inóculo + 0,156 mg de monensina ou não.

^bEPM: erro padrão da média.

^cEPD: erro padrão da diferença.

Os resultados da subtração de B_{CTL} e B_{MON} dos frascos contendo substrato (CTL e MON) para se estimar as produções líquidas de gás e CH_4 e MO residual líquida são apresentados na Tabela 4. O CTL corrigido com B_{CTL} (a seguir referido como CTL_{corrig}) apresentou maiores ($P \leq 0,01$) produções líquidas de gás e CH_4 (mL) do que MON corrigida para B_{CTL} ou B_{MON} .

Tabela 4 – Efeito da subtração do Branco Controle ou Branco Monensina dos frascos contendo substrato para se estimar as produções líquidas de gás e CH₄ e a degradação verdadeira da matéria orgânica (Experimento 1)

Valores líquidos	Estimativa dos contrastes ^a			Contrastes			
	c/ Branco Controle		c/ Branco Monensina	CTL – B _{CTL} vs MON – B _{CTL}		CTL – B _{CTL} vs MON – B _{MON}	
	CTL – B _{CTL}	MON – B _{CTL}	MON – B _{MON}	EPD ^b	P-valor	EPD ^b	P-valor
Gás (ml)	77,6	61,9	67,1	2,16	< 0,01	3,06	0,01
Gás (ml/g MO _{degradada})	225,8	194,8	209,4	6,15	< 0,01	9,14	0,11
CH ₄ (ml)	9,4	5,6	6,9	0,65	< 0,01	0,93	0,01
CH ₄ (ml/g MO _{degradada})	27,3	17,5	21,5	1,72	< 0,01	1,33	< 0,01
MO residual (mg)	88,1	113,9	110,6	3,73	< 0,01	5,27	< 0,01
DVMO (%) ^c	79,6	73,6	74,4	0,52	< 0,01	0,66	< 0,01

^aCTL–B_{CTL}: Controle corrigido para Branco Controle; MON–B_{CTL}: Monensina corrigida para Branco Controle; MON–B_{MON}: Monensina corrigida para Branco Monensina.

^bEPD: erro padrão da diferença.

^cMO total por frasco igual a 432,3 mg (base de MS) em 500 mg de substrato seco ao ar.

A produção líquida de gás, expressa em mL/g MO_{degradada}, também foi maior ($P < 0,01$) para CTL_{corrig} do que para MON corrigida com B_{CTL}. Contudo, não houve diferença ($P = 0,11$) para esta variável quando CTL_{corrig} foi comparado com MON corrigida para B_{MON}. A produção líquida de CH₄, expressa em mL/g MO_{degradada}, foi maior ($P < 0,01$) para CTL_{corrig} do que MON corrigida com B_{CTL} ou B_{MON} (Tabela 4).

A MO residual líquida (mg) foi menor ($P < 0,01$) para CTL_{corrig} em comparação a MON corrigida com B_{CTL} ou B_{MON}. Por fim, CTL_{corrig} apresentou o maior ($P < 0,01$) valor de DVMO, independente da correção de MON ser feita com B_{CTL} ou B_{MON} (Tabela 4).

4.3.2 Experimento 2 – carvacrol, eugenol e 1,8-cineol

Os efeitos de carvacrol, eugenol e 1,8-cineol sobre a fermentação *in vitro* dos frascos contendo substrato ou dos brancos são apresentados na Tabela 5. Houve decréscimo ($P \leq 0,05$) nas produções totais de gás e CH_4 com a inclusão de carvacrol e eugenol, seja nos frascos com substrato ou nos brancos. Por outro lado, o 1,8-cineol não apresentou efeito ($P > 0,10$) sobre a produção total de gás dos frascos com substrato e dos brancos. Contudo, esta substância reduziu a produção total de CH_4 dos frascos contendo substrato ($P < 0,05$), porém sem efeito sobre os brancos ($P = 0,95$).

A MO residual total (mg) foi maior ($P < 0,01$) para CAR, EUG, CIN em comparação ao CTL. Em contrapartida, esta mesma variável não foi afetada ($P > 0,10$) pela adição destes óleos essenciais nos brancos (Tabela 5).

Os resultados da subtração de B_{CTL} ou brancos específicos dos frascos contendo substrato, a fim de se obter os valores líquidos das produções de gás e CH_4 , MO residual e DVMO são mostrados na Tabela 6. O $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ apresentou maiores ($P < 0,01$) produções líquidas de gás e CH_4 (mL) do que CAR ou EUG corrigidos com B_{CTL} ou brancos específicos. Todavia, é importante ressaltar que CAR corrigido com B_{CTL} apresentou estimativas negativas de produção de gás e CH_4 . Isto ocorreu pois os volumes de gás e CH_4 produzidos foram maiores para B_{CTL} (46,1 e 2,1 mL, respectivamente) do que para CAR (39,7 e 0,6 mL, respectivamente). Por outro lado, $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ e CIN corrigido com B_{CTL} ou B_{CIN} apresentaram valores semelhantes ($P > 0,10$) de produção líquida de gás (mL). No entanto, CIN afetou ($P = 0,02$) a produção de CH_4 (mL) quando corrigida para B_{CTL} , mas não ($P = 0,07$) quando corrigida para B_{CIN} .

O $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ apresentou maiores ($P \leq 0,02$) produções líquidas de gás e CH_4 , expressas em mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$, quando comparado ao CAR e EUG corrigidos tanto para B_{CTL} como branco específico (Tabela 6).

Tabela 5 – Efeito do carvacrol, eugenol e 1,8-cineol em 16 h de fermentação ruminal *in vitro* dos frascos contendo substrato e dos brancos (Experimento 2)

Item	Tratamento ^a								EPM ^b	Contrastes						
	com substrato				Branco					EPD ^c	<i>P</i> -valor p/ CTL vs.			<i>P</i> -valor p/ B _{CTL} vs.		
	CTL	CAR	EUG	CIN	B _{CTL}	B _{CAR}	B _{EUG}	B _{CIN}			CAR	EUG	CIN	B _{CAR}	B _{EUG}	B _{CIN}
Gás total (ml)	115,0	39,7	97,9	112,3	46,1	32,2	39,2	42,7	2,05	2,42	< 0,01	< 0,01	0,27	< 0,01	0,01	0,18
CH ₄ total (ml)	11,2	0,6	3,7	9,7	2,1	0,4	0,9	2,1	0,40	0,54	< 0,01	< 0,01	0,02	< 0,01	0,05	0,95
MO residual total (mg)	131,0	235,0	164,8	156,3	25,7	31,0	30,4	29,1	4,45	6,28	< 0,01	< 0,01	<0,01	0,42	0,47	0,60

^aCTL, CAR, EUG, CIN: Controle, Carvacrol, Eugenol e 1,8-Cineol, frascos contendo 500 mg de substrato seco ao ar + 50 ml de meio + 25 ml de inóculo + ausência de aditivo ou 50 mg de carvacrol, eugenol ou 1,8-cineol (667 mg/L de fluido ruminal tamponado), respectivamente; B_{CTL}, B_{CAR}, B_{EUG}, B_{CIN}: Branco Controle, Branco Carvacrol, Branco Eugenol e Branco 1,8-Cineol, frascos sem substrato contendo 50 ml de meio + 25 ml de inóculo + ausência de aditivo ou 50 mg de carvacrol, eugenol ou 1,8-cineol (667 mg/L de fluido ruminal tamponado), respectivamente.

^bEPM: erro padrão da média.

^cEPD: erro padrão da diferença.

Tabela 6 – Efeito da subtração do Branco Controle ou Brancos Específicos dos frascos contendo substrato para se estimar as produções líquidas de gás e CH₄ e a degradação verdadeira da matéria orgânica (Experimento 2)

Valores líquidos	Estimativa do contraste ^a							Contrastes (Valor de <i>P</i>)							
	c/ Branco Controle				c/ Branco Específico			CTL – B _{CTL} vs.				CTL – B _{CTL} vs.			
	CTL – B _{CTL}	CAR – B _{CTL}	EUG – B _{CTL}	CIN – B _{CTL}	CAR – B _{CAR}	EUG – B _{EUG}	CIN – B _{CIN}	EPD ^b	CAR – B _{CTL}	EUG – B _{CTL}	CIN – B _{CTL}	EPD ^b	CAR – B _{CAR}	EUG – B _{EUG}	CIN – B _{CIN}
Gás (ml)	68,9	- 6,5	51,7	66,1	7,5	58,7	69,5	2,42	< 0,01	< 0,01	0,27	3,42	< 0,01	< 0,01	0,85
Gás (ml/g MO _{degradada})	213,0	- 30,4	178,8	222,0	27,3	199,6	231,0	5,82	< 0,01	< 0,01	0,17	4,43	< 0,01	0,02	< 0,01
CH ₄ (ml)	9,1	- 1,5	1,6	7,6	0,2	2,7	7,6	0,54	< 0,01	< 0,01	0,02	0,76	< 0,01	< 0,01	0,07
CH ₄ (ml/g MO _{degradada})	28,2	- 6,7	5,6	25,7	0,7	9,3	25,2	2,06	< 0,01	< 0,01	0,26	2,32	< 0,01	< 0,01	0,23
MO residual (mg)	105,2	209,2	139,0	130,6	204,0	134,4	127,2	6,28	< 0,01	< 0,01	< 0,01	8,89	< 0,01	< 0,01	0,02
DVMO (%) ^c	75,4	51,2	67,6	69,5	52,4	68,6	70,3	1,60	< 0,01	< 0,01	0,01	1,58	< 0,01	< 0,01	0,02

^aCTL – B_{CTL}: Controle corrigido para Branco Controle; CAR – B_{CTL}, EUG – B_{CTL}, CIN – B_{CTL}: Carvacrol, Eugenol ou 1,8-Cineol corrigidos para Branco Controle; CAR – B_{CAR}, EUG – B_{EUG}, CIN – B_{CIN}: Carvacrol, Eugenol ou 1,8-Cineol corrigidos para os Brancos Específicos.

^bEPD: erro padrão da diferença.

^cMO total por frasco igual a 432,3 mg (base de MS) em 500 mg de substrato seco ao ar.

Novamente, a correção de CAR com B_{CTL} resultou em produções líquidas negativas de gás e CH_4 (mL/g $MO_{degradada}$), o que foi ocasionado pela maior produção total de gás e CH_4 do B_{CTL} em relação ao CAR. De maneira contrária, a correção de CIN com B_{CIN} resultou em maior ($P < 0,01$) produção líquida de gás (mL/g $MO_{degradada}$) quando comparada com CTL_{corrig} . Entretanto, ao se corrigir CIN com B_{CTL} não foram observadas diferenças ($P = 0,17$). A produção líquida de CH_4 , expressa em mL/g $MO_{degradada}$, não foi alterada ($P > 0,10$) por 1,8-cineol, independentemente de ser corrigida com B_{CTL} ou B_{CIN} (Tabela 6).

Tanto para a correção com B_{CTL} ou branco específico, a inclusão de CAR, EUG ou CIN resultou em maior ($P \leq 0,02$) MO residual líquida do que CTL_{corrig} . Logo, CTL_{corrig} apresentou a maior ($P \leq 0,02$) DVMO, não importando se CAR, EUG ou CIN foram corrigidos com B_{CTL} ou brancos específicos (Tabela 6).

4.4 Discussão

No caso da monensina, há duas explicações para o decréscimo nas produções de gás e CH_4 e DVMO (Tabela 3). Primeiramente, monensina aumenta a produção de propionato (RUSSEL; STROBEL, 1988) e, de acordo com a estequiometria da produção de gases, a formação de propionato está associada com decréscimos nas produções de gás e CH_4 (WOLIN, 1960). Em nosso trabalho, a produção de CH_4 foi de 27,3 mL/g $MO_{degradada}$ para CTL_{corrig} e 21,5 mL/g $MO_{degradada}$ para MON corrigida para B_{MON} , o que representa redução de 21% (Tabela 4). Reduções de CH_4 de 48, 52 e 58% foram observadas quando monensina foi adicionada *in vitro* nas concentrações de 2,5; 5,0 e 12,5 mg/L, respectivamente (RUSSEL; STROBEL, 1988). Em segundo lugar, monensina também reduz a degradação *in vitro* da MO, o que é sustentado pela maior ($P < 0.01$) MO residual do tratamento MON (145,1 mg) comparado ao CTL (119,3 mg; Tabela 3). Esta redução na degradação de MO é típica limitação de experimentos *in vitro* de curta duração, pois monensina inibe bactérias gram-positivas relacionadas à fermentação, o que inclui alguns *Ruminococcus* sp. celulolíticos (CHEN; WOLIN, 1979). Infelizmente, nós não mensuramos a concentração de FDN nos resíduos, o que poderia fortalecer a ideia de que monensina diminui a degradação *in vitro* de fibra. Em

contrapartida, os efeitos deletérios da monensina sobre a degradação de fibra não são observados sob condições *in vivo*, pois nestas condições bactérias celulolíticas tolerantes à monensina são capazes de substituir aquelas sensíveis (RUSSELL; STROBEL, 1989).

Para carvacrol e eugenol, a redução nas produções de gás e CH₄, juntamente com incremento na MO residual total (Tabela 5), ocorreu devido às propriedades antimicrobianas e antimetanogênicas dessas substâncias. Calsamiglia et al. (2007) e Benchaar et al. (2008) revisaram detalhadamente os efeitos do carvacrol e eugenol sobre a fermentação ruminal. Os efeitos do 1,8-cineol na fermentação foram menos evidentes (Tabela 5), demonstrando que este composto não possui potente atividade antimicrobiana. De maneira semelhante, ciclodextrinas de cineol apresentaram efeitos modestos sobre a fermentação ruminal *in vitro*, inclusive com aumento na produção de CH₄ (TATSUOKA et al., 2008).

A redução ($P < 0,05$) nas produções de gás e CH₄ dos brancos devido às inclusões de monensina, carvacrol e eugenol indica que estes aditivos foram capazes de afetar a fermentação da MO oriunda do inóculo. É claro que, uma vez desenvolvidos para modificar a fermentação ruminal, aditivos podem tanto afetar a fermentação da MO do substrato como do inóculo. Todavia, é importante termos em mente que as partículas do alimento oriundas do inóculo já sofrem degradação mesmo antes do início da incubação *in vitro*. Isto ocorre pois os processos de colonização e fermentação iniciam-se no rúmen dos carneiros doadores. Consequentemente, a maioria do gás produzido pela fermentação da MO do inóculo é liberada nas primeiras horas após incubação. Logo, considerando-se a necessidade de certo intervalo de tempo para o início da ação do aditivo, era de se esperar que os aditivos fossem menos efetivos nos brancos do que nos frascos contendo substrato. Este padrão de resposta foi somente confirmado para o carvacrol, o aditivo que apresentou os efeitos mais pronunciados sobre a fermentação. Para o carvacrol, as produções de gás e CH₄ diminuíram em 65,5 e 94,6% nos frascos contendo substrato e 30,2 e 81,0% nos brancos, respectivamente (Tabela 5). Entretanto, para os outros tratamentos os efeitos foram similares entre os frascos com substrato e os brancos. Por exemplo, a monensina reduziu as produções de gás e CH₄ em 9,7 e 24,2% nos frascos contendo substrato e em 6,2 e 21,9% nos

brancos (Tabela 3). Para o eugenol, a produção de gás foi 15% menor tanto para frascos com substrato como para os brancos (Tabela 5). Estas discrepâncias são provavelmente reflexo das diferentes atividades antimicrobianas dos aditivos testados.

Os efeitos da monensina, do carvacrol e do eugenol sobre a fermentação dos brancos claramente confirmam que a correção das produções de gás e CH_4 usando B_{CTL} (branco sem aditivo) é prática inapropriada. As Tabelas 4 e 6 mostram que a correção com B_{CTL} superestimou os efeitos dos aditivos quando comparada com a correção feita com os brancos específicos. Como exemplo, a produção líquida de gás foi 225,8 e 194,8 mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$ para o $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ e MON corrigida para B_{CTL} ($P < 0,01$), respectivamente. Porém, quando MON foi corrigida com B_{MON} , a estimativa da produção líquida de gás aumentou para 209,4 mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$, resultado que não diferiu do $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ ($P < 0,11$; Tabela 4). De maneira semelhante, no Experimento 2 a produção líquida de gás foi 213,0 e 222,0 mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$ para $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ e CIN ajustado para B_{CTL} ($P < 0,17$), respectivamente. Neste caso, a estimativa da produção líquida de gás aumentou para 231,0 mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$ quando CIN foi ajustado para B_{CIN} , valor este que foi maior do que $\text{CTL}_{\text{corrig}}$ ($P < 0,01$; Tabela 6).

Aditivos incluídos sob doses elevadas ou que apresentem forte atividade biológica aumentam o erro associado à correção com B_{CTL} . Em nosso caso, isso foi claramente confirmado para CAR, o aditivo que dentre os testados apresentou a maior atividade antimicrobiana. A correção das produções de gás e CH_4 do tratamento CAR usando B_{CTL} resultou em estimativas negativas e irreais (Tabela 6).

O uso de brancos específicos também apresenta outras vantagens adicionais, particularmente quando o aditivo, por si só, pode ser usado como substrato pelas populações microbianas. Como exemplo, extratos brutos de plantas podem conter açúcares fermentáveis. Logo, o uso de branco específico poderia ser usado para descontar as quantidades de gás e CH_4 produzidas pela degradação desse substrato adicional. Tal aplicação já foi feita ao se avaliar plantas moídas contendo substâncias capazes de modificar a fermentação ruminal (GOEL; MAKKAR; BECKER, 2008).

Em alguns casos, brancos específicos podem não ser necessários ou até mesmo viáveis. Como exemplo, em nosso estudo o 1,8-cineol apresentou pouco efeito sobre a fermentação, o que torna desnecessário o uso de branco específico. A inclusão

de brancos específicos aumenta drasticamente o número de frascos, o que é bastante relevante em estudos que visam avaliar simultaneamente diversos aditivos, como os apresentados por Bodas et al. (2008), García-González et al. (2008) e Soliva et al. (2008). Adicionalmente, é importante frisar que qualquer esforço no intuito de reduzir a quantidade de MO do inóculo também diminui a necessidade de brancos específicos.

Por fim, a Tabela 6 mostra que a produção líquida de gás para CAR corrigido para B_{CAR} (7,5 mL) foi muito pequena ao ser comparada com sua DVMO (52,4%). Consequentemente, a produção líquida de gás foi somente 27,3 mL/g $MO_{degradada}$, o que é muito menor do que os 213 mL/g $MO_{degradada}$ do CTL. Resultados similares também ocorreram para a produção de CH_4 expressa em mL/g $MO_{degradada}$. A degradação foi muito maior do que a produção de gás porque o substrato não-degradado (dieta com 80% de concentrado e 20% de volumoso, contendo 62,7% de milho) foi parcialmente solubilizado pelo meio de incubação e pela solução de detergente neutro usada para a determinação da degradação verdadeira. A adição de 50 mg de carvacrol apresentou o efeito mais pronunciado dentre os aditivos testados. Como resultado, mais substrato não-degradado foi obtido após 16 h de incubação. A solução de detergente neutro foi desenvolvida para solubilizar o conteúdo celular dos vegetais, porém também solubiliza parcialmente o amido (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). Como resultado final, a DVMO foi superestimada para o tratamento CAR.

4.5 Conclusão

Neste trabalho nós demonstramos que a inclusão de modificadores de fermentação ruminal afetou a fermentação da matéria orgânica do substrato e do inóculo. Assim, a correção das produções de gás e CH_4 usando brancos sem aditivo superestimou o efeito dos aditivos testados. Além disso, aditivos incluídos em elevadas dosagens ou que apresentem elevado efeito biológico aumentam o erro associado à correção com brancos sem aditivo. Portanto, a fim de se obter as produções líquidas de gás e CH_4 , além da degradabilidade verdadeira de matéria orgânica, nós sugerimos o uso de brancos específicos, que correspondem ao frasco de incubação contendo somente inóculo ruminal, meio de incubação e o aditivo a ser testado.

Referências

AGARWAL, N.; SHEKHAR, C.; KUMAR, R.; CHAUDHARY, L.C.; KAMRA, D.N. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 148, n. 2-4, p. 321-327, 2009.

ALEXANDER, G.; SINGH, B.; SAHOO, A.; BHAT, T.K. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 229-244, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Gaithersburg, 2006.

ARAUJO, R.C.; PIRES, A.V.; ABDALLA, A.L.; PEÇANHA, M.R.S.R.; SALLAM, S.M.A. Monensina sódica como controle positivo para estudos sobre manipuladores da fermentação ruminal utilizando a técnica de produção de gás *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Resumos...** Maringá: SBZ, 2009. 1 CD ROM.

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

BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, A.B.; WALLACE, R.J.; GONZÁLEZ, J.S. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 245-258, 2008.

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

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

CHEN, M.; WOLIN, M.J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 72-77, 1979.

GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; BODAS, R.; GONZÁLEZ, J.S. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 36-52, 2008.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, n. 3/4, p. 261-281, 1998.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 72-89, 2008.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington: USDA, ARS, 2007. (Agriculture Handbook, 379).

LONGO, C.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; GODOY, P.B.; CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington: National Academic Press, 2007. 292 p.

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

PRESTON, T.R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. 305 p. (Animal Production and Health Paper, 126). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/v9327e/v9327e00.HTM>>. Acesso em: 25 jul. 2010.

RUSSELL, 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.

_____. Effects of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 1, p. 9-30, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS systems for Windows PC**: versão 9.1.3. Cary, 2004.

SELJE-ASSMANN, N.; HOFFMANN, E.M.; BECKER, K. A batch incubation assay to screen plant samples and extracts for their ability to inhibit rumen protein degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 302-318, 2008.

SOLIVA, C.R.; ZELEKE, A.B.; CLÉMENT, C.; HESS, H.D.; FIEVEZ, V.; KREUZER, M. *In vitro* screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 53-71, 2008.

TATSUOKA, N.; HARA, K.; MIKUNI, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; ITABASHI, H. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. **Animal Science Journal**, v. 79, n. 1, p. 68-75, 2008.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3/4, p. 185-197, 1994.

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

WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, n. 10, p. 1452-1459, 1960.

5 EFEITO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS BRASILEIRAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

Resumo

Muitas são as plantas nativas do Brasil que possuem óleos essenciais e apresentam atividade antimicrobiana cientificamente comprovada. O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito de óleos essenciais sobre a fermentação ruminal utilizando a técnica semiautomática de produção de gás *in vitro*. Foram selecionados os óleos essenciais de **erva-baleeira** (*Cordia verbenacea*), **aroeira vermelha** (*Schinus terebinthifolius*; extraído das folhas ou frutos), **macela** (*Achyrocline satureoides*), **guaco** (*Mikania glomerata*), **carqueja** (*Baccharis cylindrica*), **arnica** (*Lychnophora pinaster*), **capim cidreira** (*Cymbopogon citratus*), **capim limão** (*Cymbopogon flexuosus*) e **citronela** (*Cymbopogon winterianum*). Foram também incluídos os óleos resinóides de **copaíba mari-mari** (*Copaifera reticulata*), **copaíba angelim** (*Copaifera multijuga*), **copaíba zoró** (*Copaifera langsdorfii*) e **copaíba vermelha** (*Copaifera langsdorfii*). Os óleos foram independentemente avaliados sob duas condições de incubação: i) feno de coastcross (*Cynodon* sp.) como substrato + inóculo de carneiros mantidos em pastagens; ii) dieta de 80:20 concentrado:volumoso como substrato + inóculo de carneiros adaptados à mesma dieta. As doses utilizadas foram 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado. A exceção foi erva-baleeira, cujas doses foram 37,5 e 75 µL/75 mL. A monensina (2,08 mg/L) foi usada como controle positivo. Os óleos essenciais de erva-baleeira, macela e os quatro óleos de copaíba pouco alteraram a fermentação. Os outros óleos apresentaram claro efeito antimicrobiano, evidenciado principalmente pela redução da degradação verdadeira da matéria orgânica. Os resultados mais promissores foram observados ao se incubar dieta de alto concentrado. Os óleos essenciais que apresentaram melhores resultados foram aroeira vermelha (folhas e frutos) e arnica. Nestas condições, esses óleos aumentaram a concentração de propionato, reduziram a relação acetato:propionato e/ou diminuíram a produção de CH₄. Os óleos essenciais de aroeira vermelha (extraídos das folhas e dos frutos) e arnica foram selecionados para subsequente avaliação *in vivo*.

Palavras-chave: Compostos secundários de plantas; Manipulação ruminal; Metano; Produção de gás; Terpenos

Abstract

Various Brazilian plants contain essential oils and possess scientific-proved antimicrobial activities. The objective of this work was to determine the effects of essential oils on ruminal fermentation by using the semi-automated *in vitro* gas production system. The selected essential oils were: **cordia** (*Cordia verbenacea*), **Brazilian peppertree** (*Schinus terebinthifolius*; extracted from leaves or fruits), **macela** (*Achyrocline satureoides*), **guaco** (*Mikania glomerata*), **carqueja** (*Baccharis cylindrica*),

arnica (*Lychnophora pinaster*), **West Indian lemongrass** (*Cymbopogon citratus*), **East Indian lemongrass** (*Cymbopogon flexuosus*) and **citronella** (*Cymbopogon winterianum*). Oleoresins from **copaiba mari-mari** (*Copaifera reticulata*), **copaiba angelim** (*Copaifera multijuga*), **copaiba zoro** (*Copaifera langsdorfii*), and **copaiba vermelha** (*Copaifera langsdorfii*) were also included. Essential oils were independently assessed using two incubation conditions: i) coastcross (*Cynodon* sp.) hay as substrate + inoculum from animals on pasture; ii) 80:20 concentrate:forage diet as substrate + inoculum from animals fed this same diet. Experimental doses were 75 and 150 μL /75 mL of buffered rumen fluid. The only exception was cordia, in which experiment the doses used were 37.5 and 75 μL /75 mL. Monensin (2.08 mg/L) was also included as a positive control. The essential oils from cordia, macela and all copaiba oleoresins had little effect on *in vitro* rumen fermentation. The remaining essential oils showed a clear antimicrobial effect, noticed mainly on truly degraded organic matter. The most promising results were obtained when the high-concentrate diet was incubated. The best results were observed for Brazilian peppertree (leaves and fruits) and arnica essential oils. In this condition, these oils increased propionate concentration, had lower acetate to propionate ratio, and/or reduced CH_4 production. The essential oils from Brazilian peppertree (obtained from leaves and fruits) as well as arnica were selected for further *in vivo* evaluation.

Keywords: Gas production; Methane; Plant secondary compounds; Rumen manipulation; Terpenes

5.1 Introdução

Ionóforos (ex: monensina sódica) são os aditivos comerciais mais utilizados na manipulação da fermentação ruminal e na melhoria da eficiência alimentar (RUSSEL; STROBEL, 1989). Devido a questões de saúde pública, em 2006 a União Europeia banuiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento (OJEU, 2003), sendo os ionóforos uma das classes proibidas. À parte do debate originado por esta decisão, o fato é que não há comprovação científica de que ionóforos causem resistência microbiana aos antibióticos (RUSSELL; HOULIHAN, 2003). Todavia, a União Europeia é formadora de opinião, sendo grandes as chances de que exportadores mundiais de carne sejam pressionados a seguir esta decisão dentro de futuro próximo.

Na tentativa de reproduzir os benefícios dos ionóforos, pesquisadores exploram as propriedades antimicrobianas dos compostos secundários dos vegetais (CALSAMIGLIA et al., 2007). Estes metabólitos possuem vantagens em relação aos antibióticos, basicamente por serem bem aceitos pelos consumidores e geralmente considerados pelas agências reguladoras como seguros ao consumo humano (status

GRAS; *generally recognized as safe*). Adicionalmente, o aparecimento de microrganismos resistentes a estes compostos é bastante improvável, já que são constituídos de complexa mistura de princípios ativos, possuindo amplo espectro de ação (ACAMOVIC; BROKER, 2005). Ao desafiar a célula bacteriana por diversas frentes, minimiza-se o risco de aparecimento de resistência. Porém, tais características reduzem a seletividade contra as populações microbianas, dificultando a manipulação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007).

São várias as plantas nativas do Brasil que possuem óleos essenciais e apresentam atividade antimicrobiana cientificamente comprovada. Dentre elas, foram selecionados os óleos essenciais de **erva-baleeira** [*Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae)], **aroeira vermelha** [*Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae); óleo essencial extraído das folhas ou frutos], **macela** [*Achyrocline satureoides* (Lam.) DC. (Asteraceae)], **guaco** [*Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae)], **carqueja** [*Baccharis cylindrica* (Less.) DC. (Asteraceae)] e **arnica** [*Lychnophora pinaster* Mart. (Asteraceae)]. Devido à grande disponibilidade e ampla utilização por nossa cultura, foram incluídos os óleos essenciais de três plantas de origem asiática: **capim cidreira** [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (Poaceae)], **capim limão** [*Cymbopogon flexuosus* (DC.) Stapf (Poaceae)] e **citronela** [*Cymbopogon winterianum* Jowitt. (Poaceae)]. Por fim, foram também incluídos os óleos resinóides de quatro tipos de copaíbas (Leguminosae - Caesalpinioideae): **copaíba mari-mari** (*Copaifera reticulata* Ducke), **copaíba angelim** (*Copaifera multijuga* Hayne), **copaíba zoró** (*Copaifera langsdorfii* Desf.) e **copaíba vermelha** (*Copaifera langsdorfii* Desf.).

A hipótese deste trabalho é que os óleos essenciais selecionados possuem atividade antimicrobiana e, portanto, são capazes de modificar a fermentação ruminal. O objetivo foi determinar o efeito dos óleos essenciais na fermentação ruminal *in vitro*, de maneira a encontrar resultados positivos semelhantes aos dos ionóforos.

5.2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos entre fevereiro de 2008 e maio de 2010 no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP. A

semelhança entre os óleos essenciais foi utilizada como critério para a organização dos experimentos. Logo, óleos avaliados dentro de um mesmo ensaio apresentavam algum grau de afinidade (espécie, gênero, serem plantas nativas do Brasil etc). Isto facilitará as futuras publicações, de maneira a organizar os artigos sob ótica temática.

Todos os óleos foram separadamente avaliados sob duas condições de incubação: i) feno de Coastcross (*Cynodon* sp.) como substrato + inóculo de carneiros mantidos em pastagens; ii) dieta de 80:20 concentrado:volumoso como substrato + inóculo de carneiros adaptados à mesma dieta.

As doses utilizadas foram 75 ou 150 μ L em 75 mL de fluido ruminal tamponado, correspondendo a 1 ou 2 μ L/mL, respectivamente. A única exceção foi o óleo de erva baleeira, avaliado nas doses de 37,5 e 75 μ L/75 mL. Neste experimento, possuíamos quantidade muito pequena deste óleo, o que nos abrigou a reduzir as doses pela metade. As doses foram escolhidas levando-se em conta trabalhos que avaliaram diversos óleos essenciais sob condições *in vitro* (BUSQUET et al., 2005c, 2006; CARDOZO et al., 2005; CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006; CASTILLEJOS, 2008; AGARWAL et al., 2009). Considerando a densidade média do óleo essencial como 0,85 g/mL, então as doses de 37,5; 75 e 150 μ L corresponderiam a 425, 850 e 1700 mg/L. Os óleos foram adicionados momentos antes da incubação, utilizando pipeta de precisão (pipeta 20-200 μ L; Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) e sem diluição em etanol.

5.2.1 Delineamento experimental

5.2.1.1 Ensaio com óleo essencial de erva-baleeira

Para ambos os substratos, foi utilizado o delineamento em blocos completos ao acaso. A incubação, repetida três vezes, foi considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados por incubação. Logo, a média dos três frascos foi a repetição. Os tratamentos foram: Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Monensina (**MON**) – CTL + 0,156 mg de monensina; **ERV37,5** – CTL + 37,5 μ L de óleo essencial de erva-baleeira; **ERV75** – CTL + 75 μ L de óleo essencial de erva-baleeira. Para a obtenção das produções líquidas de gás e CH₄ e degradação

verdadeira na matéria orgânica (DVMO) foram utilizados quatro frascos branco-controle (branco sem óleo essencial, somente com inóculo e meio de incubação) por incubação. Fez-se a média dos quatro brancos, descontando-se este valor da produção total de gás, produção total de CH₄ e matéria orgânica (MO) residual dos frascos contendo substrato. Este experimento foi o único que não utilizou brancos específicos, pois as incubações foram conduzidas antes de nos atentarmos à importância do uso de brancos específicos.

5.2.1.2 Ensaio com óleos essenciais de aroeira vermelha (folhas e frutos)

No ensaio com dieta de alto concentrado foi utilizado o delineamento em blocos completos ao acaso. A incubação, repetida cinco vezes, foi considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados por incubação. Logo, a média dos três frascos foi a repetição. Os tratamentos foram: Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Monensina (**MON**) – CTL + 0,156 mg de monensina; **AFL75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de aroeira extraído das folhas; **AFL150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de aroeira extraído das folhas; **AFT75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de aroeira extraído dos frutos; **AFT150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de aroeira extraído dos frutos. No ensaio com feno foram utilizados os mesmos delineamento, tratamentos e brancos, porém as incubações foram repetidas três vezes.

5.2.1.3 Ensaio com óleos essenciais de capim cidreira, capim limão e citronela

Para ambos os substratos foi utilizado o delineamento em blocos completos ao acaso. A incubação, repetida três vezes, foi considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados em cada incubação. Logo, a média dos três frascos foi considerada a repetição. Os tratamentos foram: Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Monensina (**MON**) – CTL + 0,156 mg de monensina; **CID75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de capim cidreira; **CID150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de capim cidreira; **LIM75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de capim

limão; **LIM150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de capim limão; **CIT5** – CTL + 75 µL de óleo essencial de citronela; **CIT150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de citronela.

5.2.1.4 Ensaio com óleos essenciais de macela, guaco, carqueja e arnica

No ensaio com dieta de alto concentrado utilizou-se o delineamento em blocos completos ao acaso. A incubação, repetida quatro vezes, foi considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados em cada incubação. Logo, a média dos três frascos foi considerada a repetição. Os tratamentos foram: Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Monensina (**MON**) – CTL + 0,156 mg de monensina; **MAC75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de macela; **MAC150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de macela; **GUA75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de guaco; **GUA150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de guaco; **CAR75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de carqueja; **CAR150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de carqueja; **ARN75** – CTL + 75 µL de óleo essencial de arnica; **ARN150** – CTL + 150 µL de óleo essencial de arnica.

Devido a problemas no cromatógrafo gasoso, foram perdidos os dados de CH₄ de uma das incubações com dieta de alto concentrado. Para o ensaio com feno de Coastcross, foram utilizados os mesmos delineamento e tratamentos. Todavia, as incubações foram repetidas três vezes.

5.2.1.5 Ensaio com óleos resinóides de copaíba mari-mari, copaíba angelim, copaíba zoró e copaíba vermelha

Para ambos os substratos, foi utilizado o delineamento em blocos completos ao acaso. A incubação, repetida três vezes, foi considerada como bloco. Três frascos por tratamento foram usados em cada incubação. Logo, a média dos três frascos foi considerada a repetição. Os tratamentos foram: Controle (**CTL**) – frasco com substrato + inóculo + meio de incubação; Monensina (**MON**) – CTL + 0,156 mg de monensina; **MARI75** – CTL + 75 µL de óleo resinóide de copaíba mari-mari; **MARI150** – CTL + 150 µL de óleo resinóide de copaíba mari-mari; **ANGE75** – CTL + 75 µL de óleo resinóide

de copaíba angelim; **ANGE150** – CTL + 150 µL de óleo resinóide de copaíba angelim; **ZORO75** – CTL + 75 µL de óleo resinóide de copaíba zoró; **ZORO150** – CTL + 150 µL de óleo resinóide de copaíba zoró; **VERM75** – CTL + 75 µL de óleo resinóide de copaíba vermelha; e **VERM150** – CTL + 150 µL de óleo resinóide de copaíba vermelha.

5.2.2 Preparo da solução de monensina

A solução-estoque de monensina pura (M5273 – Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA; PM = 692,85) foi preparada diluindo-se 15,6 mg em 1,0 mL de etanol puro e preservada a -10°C. Momentos antes da inoculação, 10 µL desta solução foram adicionados em cada frasco (50 mL de meio de incubação + 25 mL de fluido ruminal). Assim, a concentração final de monensina foi 0,156 mg/75 mL de fluido ruminal tamponado (2,08 mg/L ou 3 µM). De acordo com Selje-Assmann, Hoffmann e Becker (2008), 11,25 µL de etanol em 75 mL de fluido ruminal tamponado não afetaram a fermentação *in vitro*. Portanto, etanol não foi adicionado nos tratamentos restantes.

5.2.3 Condições de incubação

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) usando transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba-SP). Os frascos de vidro (volume total = 160 mL; *head space* = 85 mL) foram sequencialmente abastecidos com 500 mg de substrato seco ao ar, 50 mL de meio de incubação (meio de Theodorou descrito em PRESTON, 1995) e 25 mL de inóculo. Em seguida, os frascos foram selados com tampas de borracha (Bellco Glass Inc., Vineland, NJ, EUA), agitados manualmente e incubados em estufa de ventilação forçada (Marconi MA35, Piracicaba-SP) a 39°C.

O tempo total de incubação foi 16 h para a dieta de alto concentrado e 24 h para o feno (MAKKAR, 2004). A pressão interna do frasco foi mensurada às 3, 6, 11 e 16 h para a dieta de alto concentrado e às 4, 8, 12 e 24 h para o feno. Em cada leitura, 2,5 mL de gás foram armazenados em tubos a vácuo de 10 mL. Seringas de 5 mL (Becton

Dickson Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba-PR) foram usadas na colheita de gás. Após cada amostragem, a pressão interna dos frascos foi aliviada, sendo eles agitados manualmente e recolocados na estufa. Após 16 ou 24 h, os frascos foram imersos em água gelada (4°C).

Para a determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), aproximadamente 10 mL de sobrenadante foram armazenados em frascos de vidro mantidos a -18°C. Após esta amostragem, mensurou-se o pH com potenciômetro digital (Digimed DM21, São Paulo-SP). Por fim, foi adicionada a solução de detergente neutro para determinação da degradação verdadeira da matéria seca (DVMS) e/ou DVMO.

5.2.4 Descrição do substrato

A dieta de 80:20 concentrado:volumoso continha 62,7% milho moído, 20% de feno de coastcross, 15,0% farelo de soja, 1,0% calcário e 1,3% mistura mineral (% da matéria seca da dieta). A matéria seca (MS) da dieta total foi 91,4%, sendo a composição química (% da MS total): 15,7% proteína bruta (PB), 3,3% extrato etéreo (EE), 5,4% cinzas, 20,3% fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e 8,8% fibra insolúvel em detergente ácido (FDA). A dieta foi formulada pelo Small Ruminant Nutrition System v.1.8.0 (CANNAS et al., 2004) para atingir ou exceder as recomendações de carneiros adultos do NRC (2007).

A composição química do feno de Coastcross foi: 89,2% MS, 9,7% PB, 1,3% EE, 7,9% cinzas, 60,2% FDN e 30,6% FDA. Ambos os substratos foram processados em moinho tipo Wiley (Marconi, Piracicaba-SP) usando peneira de 1 mm.

5.2.5 Preparação do inóculo

Para as incubações com dieta de alto concentrado, os doadores de inóculo foram três carneiros Santa Inês (50 kg de peso corporal) canulados no rúmen. Os animais foram estabulados e alimentados diariamente com 1,2 kg/animal de dieta igual a incubada. O alimento foi fornecido duas vezes ao dia (7 e 17 h) em proporções iguais, sendo que a adaptação durou pelo menos 10 dias. Os carneiros tinham livre acesso à

água e mistura mineral. Antes da alimentação matinal, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram colhidas em separado e armazenadas em garrafas térmicas e caixas de isopor, respectivamente. A fração líquida foi obtida usando mangueira plástica conectada a seringa de 60 mL. A fração sólida foi retirada com auxílio de pinça. Volumes iguais de ambas as frações foram misturados em liquidificador por 10 segundos, sendo esta mistura filtrada em três camadas de fraldas de algodão e mantida em banho-maria (39°C) sob fluxo contínuo de CO₂. O inóculo final foi a mistura dos inóculos individuais dos três carneiros.

Para as incubações com feno, os mesmos três carneiros foram utilizados, porém agora mantidos em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbens*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*). Os animais tinham livre acesso à mistura mineral e água, recebendo individualmente suplementação diária de 150 g de milho moído, 65 g de farelo de soja e 4,5 g de melaço de cana. O inóculo foi preparado seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente.

5.2.6 Análises laboratoriais e cálculos

À exceção do ensaio com erva-baleeira, em cada incubação foram incluídos três brancos específicos por tratamento. Fez-se a média dos três brancos, descontando-se este valor da produção total de gás, produção total de CH₄ e MS e/ou MO residual(is) dos frascos contendo substrato.

A produção de gás foi estimada usando equação definida para as condições laboratoriais em questão:

$$V = 7,365 \times p \text{ (n = 500; dados não publicados)} \quad (1)$$

Onde: V = volume de gás (mL); p = pressão mensurada (psi). A produção total de gás foi considerada como a soma das produções parciais de cada leitura.

Para a determinação da DVMO, ao término da incubação 70 mL de solução detergente neutro (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) foram adicionados em

cada frasco, sem α -amilase e sulfito de sódio. Os frascos foram incubados em estufa a 105°C por 3 h, sendo o resíduo filtrado em cadinho, lavado com água quente/acetona e seco a 105°C por 16 h. Por fim, os cadinhos foram postos em mufla a 550°C por 4 h.

A concentração de CH₄ foi determinada injetando-se 1,0 mL de amostra em cromatógrafo gasoso Shimadzu 2014 (Shimadzu Corp., Tóquio, Japão) equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (diâmetro externo de 1,5875 mm, diâmetro interno de 1,0 mm e comprimento de 1 m; nº 19809, Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, injetor e detector por ionização de chama foram 60, 200 e 240°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio com fluxo de 10 mL/min. A concentração de CH₄ foi determinada por calibração externa usando curva analítica (0, 3, 6, 9, 12%) preparada com CH₄ puro (White Martins PRAXAIR Gases Industriais Inc., Osasco-SP; 99,5% pureza). O CH₄ produzido foi calculado de acordo com Longo et al. (2006):

$$\text{CH}_4, \text{ mL} = (\text{gás total, mL} + \text{headspace, 85 ml}) \times \text{CH}_4, \% \quad (2)$$

Para a determinação de AGCC, 1,6 mL de fluido ruminal tamponado foi centrifugado (Sorvall Superspeed RC2-B, Newton, CT, EUA; 15.000 g; 15 minutos; 4 °C) com 0,4 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro-RJ) com ácido fórmico 98-100% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; COTTYN; BOUCQUE, 1968; FILÍPEK; DVORAK, 2009) + 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM (padrão interno; PM = 116,16; CAS 88-09-5; Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Alemanha). Após a centrifugação, aproximadamente 1,2 mL foi transferido para o *vial* cromatográfico.

As concentrações dos AGCC foram determinadas seguindo as condições cromatográficas do fabricante (HEWLETT PACKARD, 1998) com algumas modificações. Injetou-se 1 µL de amostra em cromatógrafo gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25 m, 0,320 mm, 0,50 µm, J&W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA). Para a injeção automática foi usada razão de divisão de 20:1 com fluxo de H₂ de 31,35 mL/min (9,20 psi). *Liner* de vidro contendo lâ-de-vidro foi

utilizado no injetor para evitar a contaminação da coluna. O injetor e o detector por ionização de chama foram mantidos a 260°C. A rampa de aquecimento do forno foi: 80°C (1 min), 120°C (20°C/min; 3 min), 205°C (10°C/min; 2 min), sendo 16,5 min o tempo total da corrida. O hidrogênio a 1,35 mL/min foi usado como gás de arraste. No detector, os fluxos de hidrogênio, ar sintético e nitrogênio (*make up*) foram mantidos a 40, 400 e 40 mL/min, respectivamente.

A curva de calibração externa foi feita com padrões cromatográficos (Chem Service, West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6), isovalérico (99%; CAS 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4). A solução-padrão de maior concentração (denominada “super-alta”) continha 200 mM de ác. acético, 54 mM de ác. propiônico, 6 mM de ác. isobutírico, 45 mM de ác. butírico, 9 mM de ác. isovalérico e 9 mM de ác. valérico. As soluções-padrão subsequentes foram obtidas diluindo-se a solução “super alta” por 1/2 (“alta”), 1/4 (“média”), 1/8 (“baixa”) e 1/16 (“super-baixa”). Em seguida, para a preparação dos *vials* de soluções-padrão foram incluídas as mesmas quantidades de solução 3:1 ác. metafosfórico:ác. fórmico e padrão interno usadas no preparo das amostras.

As determinações de MS, cinzas, PB (analisador de N por combustão Leco FP528; Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA) e EE dos substratos foram realizadas de acordo com a AOAC (2006). As concentrações de FDN e FDA foram corrigidas para cinzas. A FDN dos substratos foi determinada pelo método não-sequencial usando α -amilase (Ankom Technology, Tecnoglobo Equipamentos, Curitiba-PR) e sulfito de sódio (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991) e a FDA conforme Goering e Van Soest (1970).

5.2.7 Descrição e caracterização dos óleos essenciais

A erva-baleeira foi cultivada no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), UNICAMP, Campinas-SP. O óleo essencial foi obtido por 4 h de destilação a vapor das folhas e caules utilizando aparelho Clevenger e

coluna de condensação. A separação do óleo essencial foi feita com funil de separação, seguido de filtragem com sulfato de sódio anidro para remoção da água residual.

Todos os outros óleos essenciais, assim como os óleos resinóides das copaíbas, foram adquiridos como produtos comerciais contendo certificado de origem (Laszlo/Aromalândia, Belo Horizonte-MG). Todos os óleos foram obtidos das folhas das plantas, à exceção do óleo essencial de aroeira extraído dos frutos. Os óleos resinóides das copaíbas foram obtidos diretamente dos troncos das árvores, de maneira semelhante ao descrito por Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006).

A identificação dos compostos secundários foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) usando aparelho HP 6890 com detector seletivo de massa HP 5975 e injetor automático HP 7673 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA). Foi utilizada a coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; metil silicone 5% como fase estacionária; J&W Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA). O gás de arraste foi o hélio a 1,0 mL/min. O espectro de massa foi adquirido via ionização por impacto de elétrons operado no modo *scan* com fonte de ionização a 70 eV. Amostras de 1 µL foram injetadas em modo split com razão de divisão 1:40. A temperatura do injetor e detector foram 220 e 250°C, respectivamente. A rampa de aquecimento do forno foi 110°C (2 min) e 300°C (5°C/min). Antes da injeção, cada óleo essencial foi diluído em acetato de etila (15 mg/mL). Os óleos de copaíba foram previamente metilados. Os compostos foram identificados comparando-se os espectros de massa com banco de dados do sistema *National Institute of Standards and Technology* (NIST), tendo como critério 95% de concordância com a literatura (ADAMS, 2001). Solução padrão de n-alcenos foi co-injetada com a amostra para calcular o índice de retenção e servir como critério adicional de identificação.

5.2.8 Análise estatística

Os dados de cada experimento foram analisados pelo Proc MIXED do SAS (2004). Os fatores do modelo foram tratamento como efeito fixo e bloco (incubação) como efeito aleatório. As médias foram obtidas pelo comando LSMEANS. As diferenças foram consideradas significativas utilizando o teste de Dunnett a $P < 0,05$. Tendências

foram consideradas a $P < 0,10$. O teste de Dunnett é específico para quando apenas um tratamento (controle) serve como referência (SAMPAIO, 1998).

5.3 Resultados e discussão

Para que esta seção não ficasse repetitiva, optou-se pela discussão conjunta dos efeitos da monensina (controle positivo) em todos os ensaios. Foram separadas somente as abordagens relacionadas às incubações de feno e dieta de alto concentrado. Logo, as discussões ficaram mais objetivas e diretas, o que também permitiu visualizar a constância dos efeitos da monensina entre incubações.

Adicionalmente, ao se iniciar pela apresentação dos efeitos da monensina, deixa-se claro o que seria manipulação de fermentação considerada benéfica. Em experimentos *in vitro*, efeitos considerados positivos são: menor produção de gás por unidade de substrato degradado, menor produção de CH_4 por unidade de substrato degradado, menor relação CH_4 :Gás, maior degradação de substrato, maior concentração de AGCC totais ou propionato, menor concentração de acetato ou relação C_2 : C_3 , menor concentração de isoácidos, etc (MAKKAR, 2004; CASTILLEJOS et al., 2008; SOLIVA et al., 2008). Todavia, para se chegar à conclusão final de efeitos positivos ou negativos, todas estas variáveis devem ser vistas de forma orquestrada.

5.3.1 Monensina como controle positivo

Incubação de forragem. MON reduziu ($P < 0,05$) a produção de gás (mL) em todos os ensaios relacionados à fermentação do feno (Tabelas 8, 11, 14, 17 e 20). Em média, esta redução foi de 23% em relação ao CTL, com variação entre 18 e 25%. A produção de gás, quando expressa em mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$, não diferiu do CTL em todos os ensaios. Porém, esta variável sempre apresentou valores numericamente inferiores ao CTL (reduções entre 6 e 14%).

MON reduziu ($P < 0,05$) a produção de CH_4 (mL) em relação ao CTL nas incubações de macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 17) e copaíbas (Tabela 20), com tendência de redução ($P < 0,10$) no ensaio de erva-baleeira (Tabela 8). Todavia, em todos os ensaios MON apresentou produções de CH_4 numericamente inferiores ao

CTL. Ao ser expressa em mL/g MO_{degradada}, a produção de CH₄ do tratamento MON não diferiu do CTL em nenhuma das incubações (Tabelas 8, 11, 14, 17 e 20). Esta ausência de diferença estatística pode ser atribuída ao elevado erro padrão da média (EPM), já que CH₄ expresso em mL/g MO_{degradada} associa variações relacionadas à medição de gás, concentração de CH₄ e resíduo de MO não degradado. Por fim, a relação CH₄:Gás foi semelhante entre CTL e MON para todos os ensaios.

Há duas explicações para o decréscimo nas produções de gás e CH₄ causada pela MON. Primeiramente, monensina reduz a degradação *in vitro* da MO, fato sustentado pela menor ($P < 0,05$) DVMO do tratamento MON em comparação ao CTL para todos os ensaios (Tabelas 8, 11, 14, 17 e 20). Os efeitos entre incubações foram bem constantes, com MON apresentando DVMO entre 13 e 18% menor que CTL. Em *in vitro* batch culture (BUSQUET et al., 2005c; 12,5 mg/L) ou em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006; 10 mg/L) a adição de monensina reduziu a degradação da FDN e da FDA.

Esta redução na degradação de MO é típica limitação de experimentos *in vitro* de curta duração, pois monensina inibe bactérias gram-positivas relacionadas à fermentação, o que inclui alguns *Ruminococcus* sp. celulolíticos (CHEN; WOLIN, 1979). Sob condições *in vivo*, não são observados efeitos deletérios sobre a degradação de fibra, já que nestas condições bactérias celulolíticas tolerantes à monensina são capazes de substituir aquelas sensíveis (RUSSELL; STROBEL, 1989).

A segunda explicação para a menor produção de gás e CH₄ é que monensina aumenta a produção de propionato (RUSSEL; STROBEL, 1988, 1989). De acordo com a estequiometria da produção de gases, a formação de propionato está associada a decréscimos nas produções de CO₂ e CH₄ (WOLIN, 1960). Esta redução na produção de gás devido à maior concentração de propionato foi a responsável pelas diferenças numéricas de produção de gás expressa em mL/g MO_{degradada}. Reduções na produção total de CH₄ de 48, 52 e 58% foram observadas ao usar *in vitro* 2,5; 5,0 e 12,5 mg/L de monensina, respectivamente (RUSSEL; STROBEL, 1988). Por fim, protozoários ruminais são sensíveis à monensina, o que também causa redução de CH₄. Protozoários são produtores de H₂ (RUSSELL; STROBEL, 1989) e vivem associados às *Archaea* metanogênicas (NEWBOLD; LASSALAS; JOUANY, 1995).

As concentrações de AGCC totais e acetato foram semelhantes entre CTL e MON para todos os ensaios (Tabelas 8, 11, 14, 17 e 20). Esperava-se decréscimo na concentração de acetato, já que bactérias gram-positivas são sensíveis à monensina, sendo elas grandes produtoras de acetato (RUSSELL; HOULIHAN, 2003). Em decorrência da menor produção de acetato, há redução na produção de CO₂ e H₂, fato que parcialmente explica a menor produção de CH₄ devido ao uso de monensina (RUSSELL; STROBEL, 1989; CALLAWAY et al., 2003). Ao conduzir várias incubações *in vitro* com monensina (10 mg/L), Castillejos et al. (2008) ora observaram menor concentração de acetato, ora observaram ausência de efeito.

A concentração de propionato aumentou ($P < 0,05$) devido à inclusão de MON nos ensaios de macela, guaco, carqueja e arnica (Tabelas 17) e copaíbas (Tabela 20). Contudo, MON sempre apresentou valores de propionato numericamente superiores ao CTL. Como discutido anteriormente, o estímulo à produção de propionato causa redução na produção de CH₄. As vias metabólicas produtoras de propionato competem com a metanogênese por H₂ (RUSSELL, 2002). Vários microrganismos produtores de propionato (Ex: *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii*) não são afetados pelo fornecimento de monensina (CALLAWAY et al., 2003).

A concentração de butirato foi menor ($P < 0,05$) para MON nos ensaios de erva-baleeira (Tabela 8), aroeira (Tabela 11) e copaíbas (Tabela 20). A produção de butirato é normalmente reduzida por monensina, pois ionóforos inibem a maior produtora de butirato, a bactéria gram-positiva *Butyrivibrio fibrisolvens* (RUSSELL; STROBEL, 1989; RUSSELL, 2002). Queda na proporção molar de butirato foi observada *in vitro* ao se incluir monensina a 10 mg/L (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006).

Quanto aos isoácidos, MON reduziu ($P < 0,05$) a concentração de isobutirato nos ensaios de erva-baleeira (Tabela 8) e copaíbas (Tabela 20), com tendência de redução ($P < 0,10$) no ensaio de aroeira (Tabela 11). A concentração de isovalerato foi reduzida ($P < 0,05$) por MON somente no ensaio de copaíbas (Tabela 20). A concentração de valerato não foi afetada em nenhum dos ensaios.

As reduções nas concentrações de isoácidos indicam menor deaminação, pois os mesmos são originados pelo catabolismo de aminoácidos de cadeia ramificada, como a valina e leucina (MACKIE; WHITE, 1990; RUSSELL, 2002). Em estudo *in vitro*,

monensina reduziu a deaminação ruminal juntamente com inibição de bactérias hiperprodutoras de NH_3 (RUSSELL et al., 1988). Busquet et al. (2006) também observaram menor concentração *in vitro* de isoácidos com 12,5 mg/L de monensina.

A relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ decresceu pela adição de MON no ensaio de erva-baleeira (Tabela 8) e copaíbas (Tabela 20), com tendência ($P < 0,10$) de redução no ensaio de macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 17). Entretanto, em todas as incubações a relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ foi numericamente menor para MON em comparação ao CTL. Este decréscimo foi fruto do aumento na concentração de propionato promovida por MON.

Por fim, os efeitos da monensina, mesmo com resultados bastante semelhantes entre os ensaios, também apresentaram certas inconsistências. Castillejos et al. (2008) observaram o mesmo padrão de variação com o uso de monensina. Os autores discutem que estas flutuações enfatizam a necessidade de se trabalhar com o maior número possível de repetições, o que nem sempre é possível em experimentos de triagem. A dose de monensina por nós utilizada pode ser considerada baixa, o que pode ter causado algumas ausências de efeito. Todavia, tal dose foi selecionada devido a promover a menor inibição possível na DVMO, mantendo-se os efeitos sobre a redução de CH_4 , produção de propionato e relação $\text{C}_2:\text{C}_3$ (ARAUJO et al., 2009).

Incubação da dieta de alto concentrado. MON reduziu ($P < 0,05$) a produção de gás nos ensaios de aroeira (Tabela 12) e macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 18), com tendência de redução ($P < 0,10$) no de copaíbas (Tabela 21). Entretanto, todos os experimentos apresentaram valores numéricos de produção de gás menores para MON em comparação ao CTL, com reduções que variaram entre 8 e 22% (Tabelas 9, 12, 15, 18 e 21). A produção de gás de MON, expressa em mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$, diferiu ($P < 0,05$) do CTL apenas no ensaio de macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 18).

O tratamento MON apresentou menor ($P < 0,05$) produção de CH_4 (mL) nos ensaios com aroeira (Tabela 12) e macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 18), com tendência de redução nos ensaios de erva-baleeira (Tabela 9) e copaíbas (Tabela 21). Sob a condição de alto concentrado, em média MON reduziu em 31% a produção total de CH_4 (mL). Em estudo com concentração similar de monensina e farelo de milho como substrato, Russell e Strobel (1989) encontraram redução de 32%. Ao ser expressa em mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$, a produção de CH_4 foi menor para MON somente no

ensaio com macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 18). Contudo, MON sempre apresentou valores inferiores ao CTL, com reduções entre 20 e 32% (Tabelas 9, 12, 15, 18 e 21). A relação CH₄:Gás foi semelhante entre CTL e MON para todos os ensaios.

Em relação à degradação, MON reduziu ($P < 0,05$) a DVMO nos ensaios de *Cymbopogon* sp. (Tabela 15) e copaíbas (Tabela 21). Entretanto, as reduções foram numericamente consistentes entre todos os ensaios (DVMO entre 4 a 8% menor que o CTL). Nas incubações de forragem, a redução média de DVMO foi 15%. O menor efeito de MON sobre a degradação da dieta de alto concentrado está de acordo com a informação de que ionóforos não afetam a degradação de amido (RUSSELL; STROBEL, 1989). Todavia, é comum observar reduções na degradação *in vitro* da MO causada por monensina (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; RUSSELL; STROBEL, 1989).

Da mesma forma que na condição de forragem, MON não afetou as concentrações de AGCC totais e acetato (Tabelas 9, 12, 15, 18 e 21). Em todas as incubações houve aumento ($P < 0,05$) de propionato (Tabelas 9, 12, 18 e 21), com exceção feita ao ensaio de *Cymbopogon* sp. (Tabela 15). A concentração de butirato foi menor ($P < 0,05$) para MON em todos os experimentos, novamente com exceção ao ensaio de *Cymbopogon* sp. Ao incubar dieta com 90% de concentrado, Castillejos et al. (2008) encontraram grande variação nos efeitos *in vitro* da monensina. Houve tanto ausência de efeito, diminuição como aumento na concentração de AGCC. Da mesma forma, a proporção molar de acetato e butirato ora foi menor ora foi igual ao controle.

Quanto aos isoácidos, MON reduziu ($P < 0,05$) as concentrações de isobutirato e isovalerato nos ensaios de aroeira (Tabela 12) e copaíbas (Tabela 21), com redução ($P < 0,05$) de isobutirato no experimento de erva-baleeira (Tabela 9) e tendência ($P < 0,10$) no ensaio de macela, guaco, carqueja e arnica (Tabela 18). Houve decréscimo na concentração de valerato somente no ensaio de copaíbas (Tabela 19). Curiosamente, Castillejos et al. (2008) observaram frequente aumento de valerato ao incubarem dieta de alto concentrado com 10 mg/L de monensina.

A relação C₂:C₃ foi menor para MON em todos os ensaios (Tabelas 9, 12, 18 e 21), exceção feita à incubação de *Cymbopogon* sp. (Tabela 15). Segundo Russel e Strobel (1988), ao se fermentar concentrado a monensina reduz C₂:C₃ devido à maior produção de propionato, enquanto que ao se fermentar forragem C₂:C₃ decresce em

resultado da menor produção de acetato. Sob nossas condições, tanto na incubação de feno como alto concentrato, C₂:C₃ decresceu pelo aumento de propionato.

Em nenhum ensaio foi verificado efeito de MON sobre o pH *in vitro* (Tabelas 12, 15, 18 e 21). A monensina *in vivo* pode causar elevação de pH, principalmente por inibir bactérias produtoras de lactato (ex: *Streptococcus bovis*; RUSSELL; STROBEL, 1989). Todavia, é comum inexistir efeitos sobre o pH *in vitro*, já que este é controlado pelos agentes tamponantes do meio. Se existentes, o efeito está comumente relacionado à inibição da fermentação e menor produção de AGCC (BUSQUET et al., 2006).

5.3.2 Ensaio com óleo essencial de erva-baleeira

Composição do óleo essencial. Os principais componentes do óleo de *C. verbenacea* foram trans-cariofileno (28,2%), α -pineno (23,6%), allo-aromadendreno (6,9%) e α -humuleno (4,5%; Tabela 7). Composição similar foi encontrada por Carvalho Jr. et al. (2004), apresentando 29,7% de α -pineno, 25,5% de trans-cariofileno, 10% de allo-aromadendreno e 4,6% de α -humuleno.

Incubação de forragem. Os tratamentos de erva-baleeira pouco alteraram a fermentação do feno (Tabela 8). Apenas ERV150 reduziu ($P < 0,05$) a DVMO e aumentou ($P < 0,05$) a relação C₂:C₃, resultados que são considerados indesejáveis.

Os efeitos farmacológicos dos óleos essenciais tendem a ser dominados pela ação de seus componentes principais, embora seja também verdade que os compostos podem modificar a ação uns dos outros (TISSERAND, 1996). Dentre os componentes do óleo de erva-baleeira, apenas α -pineno já foi avaliado no ambiente ruminal. Os efeitos relatados são bem variados. O óleo de cade (*Juniperus oxycedrus*; 35% de α -pineno; 3000 mg/L) não alterou a fermentação ruminal *in vitro* (BUSQUET et al., 2006). O óleo de zimbro (*Juniperus communis*, 35% de α -pineno; 20 mg/L) também não alterou o perfil de AGCC, embora com menor produção total de CH₄ e produção de CH₄ por mol de AGCC produzido (CHAVES et al., 2008a). Por outro lado, foi observado que o α -pineno puro (313 mg/L) diminuiu drasticamente a fermentação *in vitro* da celulose, sem efeitos inibitórios sobre a degradação de amido e celobiose (CRANE; NELSON; BROWN, 1957).

Tabela 7 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes no óleo essencial de erva-baleeira (*C. verbenacea*)

Composto	Erva-baleeira		
	t_R^1	IR ²	% relativa
α -tujeno	4,95	927	1,41
α -pineno	5,18	936	23,58
canfeno	5,47	948	0,19
sabineno	6,10	973	0,99
β -pineno	6,19	977	1,07
β -mirceno	6,54	992	0,52
β -felandreno	7,72	1029	1,20
1,8-cineol	7,79	1031	1,76
acetato de bornila	17,64	1284	0,77
Δ -elemeno	19,79	1336	1,55
n.i. ³	20,50	1353	0,31
α -copaeno	21,34	1373	0,80
β -cubebeno	21,95	1388	0,46
β -elemeno	22,04	1390	1,32
α -cedreno	22,70	1407	2,23
trans-cariofileno	23,18	1418	28,19
β -gurjuneno	23,64	1430	0,75
α -trans-bergamoteno	23,81	1434	0,37
β -(Z)-farneseno	24,13	1442	0,42
α -humuleno	24,51	1452	4,54
β -(E)-farneseno	24,69	1456	2,55
allo-aromadendreno	24,82	1459	6,90
germacreno D	25,59	1478	2,07
n.i.	25,76	1483	1,11
biciclogermacreno	26,21	1494	2,71
α -(Z)-bisaboleno	26,54	1502	1,66
β -bisaboleno	26,75	1508	3,02
n.i.	27,19	1519	0,64
Δ -cadineno	27,29	1522	2,03
δ -(E)-bisaboleno	27,62	1530	1,08
óxido de cariofileno	29,48	1579	0,93
n.i.	32,77	1668	1,42
n.i.	33,06	1676	1,47

¹ t_R = tempo de retenção (minutos); ²IR = índice de retenção; ³n.i. = não identificado.

Tabela 8 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina e Erva-baleeira em 24 h de fermentação *in vitro* do feno de Coastcross

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³
	CTL	MON	Erva-baleeira (ERV)		
			37,5	75	
Gás, mL	54,2	40,7*	52,8	50,1	3,31
Gás, mL/g MO _{degrad}	258,6	235,4	274,6	286,5	16,95
CH ₄ , mL	7,46	4,74 [†]	6,58	6,63	0,80
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	36,7	27,8	34,3	38,4	3,93
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	13,9	11,7	12,5	13,2	1,48
DVMO, %	48,8	40,0*	45,0	40,8*	1,73
AGCC, mM					
Total	76,4	72,9	74,9	76,4	2,67
Acetato	55,1	52,3	54,4	55,3	1,01
Propionato	10,9	11,6	10,4	10,5	1,14
Isobutirato	0,66	0,52*	0,65	0,69	0,108
Butirato	7,8	6,7*	7,6	7,8	0,45
Isovalerato	1,25	1,12	1,28	1,37	0,148
Valerato	0,69	0,69	0,64	0,75	0,115
C ₂ :C ₃	5,12	4,62*	5,32	5,37*	0,429

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleo essencial de erva-baleeira a 37,5 e 75 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Por fim, 2,2 mg/L (75 mg/kg MS) de óleo de cade (*Juniperus oxycedrus*; 35% de α -pineno) reduziram a relação C₂:C₃ em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a). Quanto ao trans-cariofileno, não existem informações sobre seus efeitos na fermentação ruminal. Só se sabe que o β -cariofileno pode ser degradado durante a fermentação ruminal *in vitro* (BROUDISCOU; CORNU; ROUZEAU, 2007).

Incubação da dieta de alto concentrado. O óleo essencial de erva-baleeira não modificou a fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado (Tabela 9). O único

efeito encontrado foi a queda ($P < 0,05$) na DVMO pela adição de 75 μL . Como discutido na condição de forragem, apenas o α -pineno já foi avaliado em condições ruminais.

Tabela 9 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina e Erva-baleeira em 16 h de fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado

Item ¹	Tratamentos ²				EPM ³
	CTL	MON	Erva-baleeira (ERV)		
			37,5	75	
Gás, mL	89,0	81,1	87,9	86,0	9,13
Gás, mL/g MO _{degrad}	268,8	253,8	274,0	275,9	28,56
CH ₄ , mL	12,5	9,2 [†]	12,2	12,2	1,78
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	37,4	28,7	38,2	39,3	5,75
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	13,9	11,2	14,0	13,9	1,22
DVMO, %	76,9	73,8	74,3	72,2*	1,11
AGCC, mM					
Total	88,0	88,8	84,6	92,8	3,11
Acetato	52,9	52,3	49,7	55,4	3,76
Propionato	16,6	20,6*	16,3	17,5	0,49
Isobutirato	1,30	1,05*	1,29	1,37	0,054
Butirato	12,8	11,0*	12,9	13,8	1,68
Isovalerato	3,19	2,72	3,20	3,43	0,369
Valerato	1,26	1,15	1,24	1,34	0,215
C ₂ :C ₃	3,19	2,54*	3,05	3,18	0,196

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleo essencial de erva-baleeira a 37,5 e 75 μL /75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Os resultados encontrados são inconclusivos, já que doses de α -pineno menores (BUSQUET et al., 2005a; CHAVES et al., 2008a) ou semelhantes (CRANE; NELSON; BROWN, 1957) à deste experimento foram capazes de afetar a fermentação ruminal,

enquanto doses maiores não apresentaram efeitos (Busquet et al., 2006). Ao realizar os cálculos, a maior concentração de α -pineno encontrada neste experimento foi 203 mg/L (densidade do α -pineno igual a 0,86 g/mL). De modo geral, o óleo de erva-baleeira não trouxe benefícios à fermentação ruminal.

5.3.3 Ensaio com óleos essenciais de aroeira vermelha (folhas e frutos)

Composição dos óleos essenciais. Os compostos majoritários dos óleos de aroeira foram: a) óleo extraído das folhas – 58,4% de α -pineno, 15,7% de β -pineno e 13% de limoneno; b) óleo extraído dos frutos – 25% de α -pineno, 22,4% de Δ -3-careno, 18,5% de α -felandreno, 15,9% de silvestreno e 11% de *p*-cimeno (Tabela 10).

Tabela 10 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes nos óleos essenciais de Aroeira (*S. terebinthifollius*) extraídos das folhas e dos frutos

Composto	Aroeira-folhas			Aroeira-frutos		
	t_R ¹	IR ²	% relativa	t_R (min) ¹	IR ²	% relativa
α -pineno	5,13	934	58,44	5,11	933	25,02
sabineno	6,07	972	1,02	-	-	-
β -pineno	6,18	977	15,71	6,17	976	1,08
β -mirceno	6,52	991	4,32	6,52	991	2,34
α -felandreno	6,93	1005	0,69	6,96	1006	18,51
Δ -3-careno	-	-	-	7,14	1011	22,36
<i>p</i> -cimeno	-	-	-	7,57	1024	11,02
limoneno	7,70	1028	12,98	-	-	-
silvestreno	-	-	-	7,72	1028	15,94
terpinoleno	-	-	-	9,72	1087	0,89
trans-cariofileno	23,03	1416	1,46	23,03	1416	1,55
δ -muuroleno	25,51	1477	2,31	25,51	1477	1,30
Δ -cadineno	27,20	1520	3,06	-	-	-

¹ t_R = tempo de retenção (minutos); ²IR = índice de retenção.

Médias anuais dos metabólitos principais dos óleos das folhas de três espécimes de aroeira foram: A – 35% de sabineno, 9,5% de terpinen-4-ol, 8,1% de α -copaeno e 4,8% de α -pineno, B – 22% de α -pineno, 20% de β -cariofileno, 10% de α -copaeno, 9,1% de biciclogermacreno, 8,7% de germacreno-D e 6% de β -pineno; C – 26,4% de α -pineno, 21,6% de germacreno-D, 10,8% de β -cariofileno, 7,5% de β -pineno e 6,5% de α -copaeno (SANTOS et al., 2007). Outra pesquisa brasileira também identificou o α -pineno, sabineno e biciclogermacreno como componentes majoritários do óleo essencial das folhas de *S. terebinthifollius* (SANTOS et al., 2010), enquanto amostras ricas em limoneno e *p*-cimeno foram obtidas nas Ilhas Reunidas, localizadas a leste de Madagascar (VERNIN; PARKANYI, 2003).

Quanto aos óleos essenciais dos frutos, quando obtidos de frutos não maduros apresentaram 20,6% de α -cadinol, 15,5% de δ -cadineno, 10,2% de β -pineno e 9,9% de epi- α -muurolol. Em frutos maduros encontrou-se 29,2% de Δ -3-careno, 16,1% de β -felandreno, 13% de α -felandreno e 12,9% de α -pineno (BARBOSA; DEMUNER; CLEMENTE, 2007), composição esta bastante similar à encontrada em nosso estudo.

Incubação de forragem. Todos os tratamentos com óleos de aroeira reduziram ($P < 0,05$) a produção de gás (mL) e a DVMO (Tabela 11). Isto comprova a atividade antimicrobiana dos óleos de aroeira também em condições ruminais. Todos os tratamentos causaram drásticas reduções de gás e DVMO, demonstrando que estas substâncias possuem elevada atividade antimicrobiana ou que as doses utilizadas foram excessivas. Crane, Nelson e Brown (1957) observaram que doses crescentes de α -pineno inibiram progressivamente a fermentação ruminal *in vitro* da celulose, com inibição quase total ao usar 313 mg/L. Contrariamente, observou-se que α -pineno (2 mL/L) e β -pineno (1 mL/L) aumentaram a produção de gás *in vitro*, enquanto Δ -3-careno (3 mL/L) reduziu a produção de gás (OH et al., 1967).

Os tratamentos AFL150 e AFT150 apresentaram menor ($P < 0,05$) produção de CH₄ em relação ao CTL (2,9; 2,8 e 7,1 mL para AFL150, AFT150 e CTL, respectivamente). Grande parte dessa redução foi causada pelo impacto negativo dos óleos essenciais na fermentação *in vitro*. Quanto expressa em mL/g MO_{degradada}, não houve alteração na produção de CH₄ pela adição dos óleos essenciais. Todavia, a produção de CH₄ foi numericamente menor para AFL150 e AFT150 (29,4 e 29,6 mL/g

MO_{degradada}) em comparação ao CTL (34,2 mL/g MO_{degradada}), sendo estes valores semelhantes à produção de CH₄ obtida para MON (31 mL/g MO_{degradada}).

Tabela 11 – Efeitos do Controle, Monensina e Aroeira folhas e frutos (*Schinus terebinthifollius*) em 24 h de fermentação *in vitro* do feno de Coastcross

Item ¹	Tratamentos ²						EPM ³
	CTL	MON	A. folhas (AFL)		A. frutos (AFT)		
			75	150	75	150	
Gás, mL	48,4	37,2*	29,8*	22,5*	24,4*	17,6*	5,04
Gás, mL/g MO _{degrad}	233,9	205,9	223,4	228,0	209,6	181,5	33,00
CH ₄ , mL	7,1	5,6	4,9	2,9*	3,7 [†]	2,8*	1,04
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	34,2	31,0	35,9	29,4	30,6	29,6	7,29
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	15,1	15,8	15,3	12,9	14,2	16,3	2,67
DVMO, %	49,0	42,6*	31,6*	23,7*	27,3*	23,0*	1,58
AGCC, mM							
Total	68,2	65,5	63,4	55,3*	58,5*	58,3*	7,58
Acetato	45,0	42,4	41,1	34,3*	37,1*	37,4*	6,59
Propionato	11,8	13,0	11,5	10,8	10,8	10,5	0,74
Isobutirato	0,84	0,72 [†]	0,82	0,75	0,78	0,68*	0,048
Butirato	8,3	7,3*	7,7	7,2*	7,5 [†]	7,4 [†]	0,55
Isovalerato	1,40	1,25	1,46	1,37	1,39	1,31	0,128
Valerato	0,88	0,88	0,89	0,94	0,92	0,91	0,059
C ₂ :C ₃	3,77	3,23	3,58	3,20	3,37	3,51	0,448

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleos essenciais de Aroeira-folhas e Aroeira-frutos a 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

As concentrações de AGCC totais e acetato foram menores ($P < 0,05$) para AFL150, AFT75 e AFT150 comparadas ao CTL. Estes resultados foram consequência da menor DVMO, o que resultou em menor produção de AGCC. À primeira vista, reduções na degradação e concentração de AGCC são nutricionalmente desfavoráveis

ao ruminante. Contudo, é corriqueiro encontrar tais efeitos em experimentos *in vitro* (BUSQUET et al., 2006). Óleos essenciais possuem efeito dose-dependente e, por isso, elevadas doses podem inibir a fermentação ruminal (CALSAMIGLIA et al., 2007). O mais importante nesses experimentos é determinar as produções de gás e CH₄ por unidade de substrato degradado e os câmbios de fermentação (ex: aumento na produção de propionato, menor C₂:C₃, etc).

Curiosamente, a concentração de propionato não foi afetada pelos óleos de aroeira. Devido ao drástico efeito sobre a DVMO, seria coerente encontrarmos redução substancial na concentração de propionato. Estes resultados permitem especular que os óleos de aroeira apresentaram seletividade frente às populações microbianas do rúmen, já que reduziram a concentração de acetato sem afetar propionato. Bactérias gram-positivas são as principais produtoras de acetato e butirato, enquanto normalmente se atribui às gram-negativas a produção de propionato (RUSSELL, 2002). Mesmo assim, esses resultados divergem dos verificados para MON, pois neste caso houve aumento ($P < 0,05$) de propionato, fato que não ocorreu para os óleos de aroeira.

A relação C₂:C₃ não foi afetada pelos tratamentos, nem mesmo para MON. A redução de C₂:C₃ é um dos principais efeitos da MON no rúmen (RUSSEL; STROBEL, 1989). Em números, MON e AFL150 apresentaram valores de C₂:C₃ semelhantes e menores do que o CTL. Para AFL150, isto foi devido à redução ($P < 0,05$) de acetato.

O óleo de aroeira-folhas continha 58% de α -pineno e 15,7% de β -pineno, enquanto o óleo de aroeira-frutos tinha 25% de α -pineno, 22,4% de Δ -3-careno, 18,5% de α -felandreno e 11% de *p*-cimeno (Tabela 10). Dentre estes compostos, já foram testados os efeitos do α -pineno e *p*-cimeno sobre o perfil de AGCC. O óleo de zimbro (*Juniperus communis*, 35% de α -pineno) e *p*-cimeno, ambos na concentração de 20 mg/L, não alteraram o perfil de AGCC (CHAVES et al., 2008a). Doses crescentes de α -pineno puro reduziram drasticamente a concentração total de AGCC resultante da fermentação de celulose, sem efeitos quando se fermentou amido ou celobiose (CRANE; NELSON; BROWN, 1957).

A concentração de butirato foi menor ($P < 0,05$) para AFL150 em comparação ao CTL, com tendência de redução ($P < 0,10$) para AFT75 e AFT150. Este efeito parece estar relacionado à queda na degradação, ao invés de ser atribuído a algum efeito

específico dos óleos essenciais. Quanto aos isoácidos e valerato, só AFT150 reduziu ($P < 0,05$) a concentração de isobutirato.

Incubação da dieta de alto concentrado. AFL150, AFT75 e AFT150 reduziram ($P < 0,05$) a produção de gás (mL) e a DVMO (Tabela 12). Estes resultados novamente confirmam a ação antimicrobiana dos óleos de aroeira em condições ruminais.

Tabela 12 – Efeitos do Controle, Monensina e Aroeira folhas e frutos (*Schinus terebinthifollius*) em 16 h de fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado

Item ¹	Tratamentos ²						EPM ³
	CTL	MON	A. folhas (AFL)		A. frutos (AFT)		
			75	150	75	150	
Gás, mL	72,0	62,7*	70,6	63,3*	62,3*	58,0*	3,42
Gás, mL/g MO _{degrad}	215,0	199,7	224,6	213,8	208,1	193,4*	7,01
CH ₄ , mL	8,2	5,3*	9,0	6,7	6,6	5,3*	0,99
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	24,7	16,8	28,4	22,9	22,5	18,0	3,40
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	11,6	8,6	12,7	10,7	10,8	9,1	1,53
DVMO, %	77,7	72,8	73,1	68,7*	69,6*	69,9*	2,10
AGCC, mM							
Total	86,1	85,6	86,4	86,3	82,4	87,2	6,18
Acetato	50,9	50,5	49,8	49,4	44,4	49,7	3,27
Propionato	15,2	19,2*	17,6	19,8*	19,2*	19,7*	2,10
Isobutirato	1,22	0,92*	1,10	0,85*	1,06	0,82*	0,129
Butirato	14,7	11,5*	13,7	12,5*	13,3	13,0*	1,01
Isovalerato	2,64	2,06*	2,49	2,00*	2,26	1,95*	0,370
Valerato	1,44	1,42	1,77*	1,72	1,79*	1,65	0,338
C ₂ :C ₃	3,43	2,65*	3,02	2,59*	2,52*	2,61*	0,286
pH	6,50	6,54	6,53	6,54	6,53	6,54	0,038

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleos essenciais de Aroeira-folhas e Aroeira-frutos a 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

As incubações de alto concentrado e forragem foram conduzidas em separado. Mesmo assim, observamos que a redução na degradação foi menos extensa na condição de alto concentrado em relação à forragem. Isto suporta, mais uma vez, a ideia de que esses óleos apresentam seletividade antimicrobiana nas condições ruminais. Crane, Nelson e Brown (1957) observaram que 123 mg/L de α -pineno puro, um dos principais componentes do óleo de aroeira, reduziu em 42% a degradação de celulose, enquanto que dose cinco vezes maior (613 mg/L) causou somente 29% de redução na degradação de amido.

Em comparação ao CTL, AFT150 reduziu ($P < 0,05$) a produção de gás expressa por unidade de substrato degradado (215,0 e 193,4 mL/g $MO_{degradada}$ para CTL e AFT150, respectivamente). Este resultado é extremamente interessante, pois indica de forma indireta maior eficiência de síntese microbiana. Menor produção de gás por grama de substrato degradado significa maior quantidade de C retida na massa microbiana e no propionato, não havendo perdas sob forma de CO_2 (MAKKAR, 2004). Da mesma forma, menor produção de gás por unidade de $MO_{degradada}$ é correlacionada com maior excreção urinária de derivados de purinas (maior produção de proteína microbiana) e menor emissão *in vivo* de CH_4 (MAKKAR, 2004).

Além de MON, a produção de CH_4 (mL) foi reduzida ($P < 0,05$) somente em AFT150 (8,2 e 5,3 mL para CTL e AFT150, respectivamente). Porém, ao se expressar a produção de CH_4 em mL/g $MO_{degradada}$ não foi verificado efeito dos tratamentos. Mesmo assim, o valor de AFT150 (18 mL/g $MO_{degradada}$) foi comparável a MON (16,8 mL/g $MO_{degradada}$).

As concentrações de AGCC totais e de acetato não foram afetadas pelos óleos essenciais de aroeira. Ao se fermentar amido, foi constatado que 313 mg/L não afetaram a concentração total de AGCC (CRANE; NELSON; BROWN, 1957). Em relação ao CTL, a concentração de propionato foi maior ($P < 0,05$) em AFL150, AFT75 e AFT150, sendo coerente com a menor produção de gás (mL/g $MO_{degradada}$) observada para AFT150.

Maiores concentrações de propionato estão associadas com a melhoria da utilização de energia. O composto majoritário encontrado nos óleos de aroeira foi o α -pineno (Tabela 10). O óleo de zimbro (*Juniperus communis*; 35% de α -pineno; 200

mg/kg MS) aumentou o ganho médio diário (GMD) de cordeiros (217 e 254 g/d para controle e óleo de zimbro, respectivamente). Os autores discutem que diferenças estatísticas não foram detectadas para a proporção molar de propionato, mas o óleo de zimbro numericamente aumentou a concentração de AGCC (81,0 vs 101,6 mM) e a proporção molar de propionato (29,5 vs 35,8 mol/100 mol; CHAVES et al., 2008b). Por outro lado, o uso *in vitro* do óleo de zimbro (20 mg/L) não alterou o perfil de AGCC (CHAVES et al., 2008a). Em outro estudo *in vivo*, a adição de β -pineno a *pellets* de alfafa não interferiu no CMS de cordeiros (ESTELL et al., 2002). Todavia, verificou-se que α -pineno pode reduzir o CMS (ESTELL et al., 1998).

Assim como MON, os tratamentos AFL150, AFT75 e AFT150 apresentaram menor ($P < 0,05$) relação $C_2:C_3$. Redução em $C_2:C_3$ também foi observada ao se adicionar óleo de cade (*Juniperus oxycedrus*; 35% de α -pineno; 2,2 mg/L ou 75 mg/kg MS) em sistema *in vitro* de fluxo contínuo (BUSQUET et al., 2005a). De modo inverso, Busquet et al. (2006) observaram em *in vitro batch culture* que doses de 3, 30, 300 e 3000 mg/L de óleo de cade não afetaram a proporção molar de acetato, propionato, isoácidos e $N-NH_3$. Apenas a dose 3000 mg/L aumentou a proporção molar de butirato.

O limoneno (presente em 13% no óleo de aroeira-folhas) já foi avaliado em condições de fermentação ruminal *in vitro*. A dose de 5000 mg/L foi capaz de reduzir a concentração total de AGCC, a proporção de acetato e a relação $C_2:C_3$ (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006).

As concentrações de isobutirato e isovalerato foram menores ($P < 0,05$) para AFL150 e AFT150 quando comparadas ao CTL. Embora parte dessa diminuição possa ser atribuída à queda na degradação do substrato, verifica-se que, em proporção ao CTL, a redução nas concentrações de isoácidos foi maior do que na DVMO, o que evidencia a possibilidade de menor deaminação. O isobutirato e isovalerato são produzidos pela deaminação de valina e leucina, respectivamente (RUSSELL, 2002). Certos óleos essenciais atuam somente sobre a redução da deaminação, não afetando a proteólise tampouco a peptidólise (WALLACE, 2004). Contudo, Chaves et al. (2008a) verificaram que o óleo de zimbro (*Juniperus communis*; 35% de α -pineno; 20 mg/L) aumentou a concentração *in vitro* de NH_3 , com estímulo à atividade deaminativa bacteriana, porém sem ação sobre a atividade proteolítica.

Terpenos hidrocarbonetos apresentam poder antimicrobiano significativamente menor do que os terpenos oxigenados (DORMAN; DEANS, 2000). Busquet et al. (2006) discutiram que esta pode ser a razão para a ausência de efeito do óleo de cade sobre a fermentação ruminal. Em nosso estudo, o óleo de aroeira-folhas continha 58,4% de α -pineno, 15,7% de β -pineno e 13% de limoneno. Por sua vez, o óleo extraído dos frutos continha 25% de α -pineno, 18,5% de α -felandreno e 22,4% de Δ -3-careno (Tabela 10). É correto afirmar que as ações dos componentes majoritários de um óleo essencial sempre tendem a dominar os efeitos farmacológicos encontrados, embora seja verdade que os componentes podem modificar a ação uns dos outros (TISSERAND, 1996). Assim, pelo menos para o óleo de aroeira-folhas seria sensato atribuir ao α -pineno os efeitos verificados. Mesmo assim, notamos que o óleo de erva-baleeira (23,6% de α -pineno) pouco alterou a fermentação *in vitro*. Logo, esta divergência também demonstra que a interação entre os componentes de um óleo essencial não pode ser menosprezada.

5.3.4 Ensaio com óleos essenciais de capim cidreira, capim limão e citronela

Composição do óleo essencial de capim cidreira. O óleo essencial de capim cidreira apresentou α -citral (40,5%), β -citral (34%) e β -mirceno (16%; Tabela 13). Já foi relatada composição parecida, contendo 43,1% de α -citral, 32,2% de β -citral e 17,6% de mirceno (MOREIRA et al., 2010). Barbosa et al. (2008) encontraram menores concentrações de mirceno no óleo das folhas frescas de cidreira, com 50,2% de α -citral, 31,5% de β -citral e só 1,6% de mirceno. Teores bem elevados de mirceno também já foram documentados, chegando a 23,8% mirceno, 37,4% de α -citral e 31,9% de β -citral (GUIMARÃES et al., 2008). Por fim, Furlan et al. (2010) verificaram que óleos obtidos de plantas cultivadas em Pindamonhangaba apresentavam 56,1% de α -citral e 42% de β -citral, enquanto que óleos de plantas cultivadas em Ibiúna continham 28,6% de geraniol, 22% de α -citral e 18,5% de β -citral.

Composição do óleo essencial de capim limão. O óleo de capim limão continha 48,9% de α -citral e 38,1% de β -citral (Tabela 13). Teores semelhantes, 46,1% de α -citral e 31,5% de β -citral, foram descritos por Oussalah et al. (2006). Por sua vez,

teores de geranial de 60% (TASKINEN; MATHELA; MATHELA, 1983) e 61% (KUMAR et al., 2009) foram encontrados no óleo essencial de capim limão.

Tabela 13 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes nos óleos essenciais de Capim Cidreira (*C. citratus*), Capim Limão (*C. flexuosus*) e Citronela (*C. winterianus*)

Compostos	C. cidreira			C. limão			Citronela		
	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa
canfeno	-	-	-	5,45	947	0,39	-	-	-
6-metil-5-hepten-2-ona	6,40	986	2,66	6,40	986	1,56	-	-	-
β-mirceno	6,54	991	15,95	6,52	990	0,79	-	-	-
limoneno	-	-	-	7,68	1027	1,27	7,68	1027	4,13
4-nonanona	-	-	-	9,15	1071	0,44	-	-	-
n.i. ³	10,14	1100	1,27	10,14	1100	0,76	10,14	1100	0,68
cis-β-terpineol	-	-	-	-	-	-	11,87	1143	1,45
M = 152	-	-	-	11,87	1143	0,40	-	-	-
citronelal	-	-	-	12,18	1151	1,32	12,28	1154	40,80
citronelol	-	-	-	-	-	-	15,30	1229	13,84
cis-crisantenol	12,65	1163	1,45	12,65	1163	0,86	-	-	-
M = 166	-	-	-	13,08	1174	0,57	-	-	-
M = 152	13,38	1182	2,18	13,38	1182	1,41	-	-	-
neral (ou β-citral)	15,85	1242	33,99	15,86	1242	38,12	-	-	-
geraniol	16,35	1254	2,03	16,35	1254	0,97	16,43	1256	25,69
geranial (ou α-citral)	17,12	1272	40,46	17,13	1273	48,93	17,00	1269	0,56
acetato de citronelila	-	-	-	-	-	-	20,44	1353	1,72
acetato de geranila	-	-	-	-	-	-	21,71	1383	1,75
β-elemeno	-	-	-	-	-	-	21,97	1390	2,37
trans-cariofileno	-	-	-	23,03	1416	1,10	-	-	-
δ-muuroleno	-	-	-	-	-	-	25,51	1477	0,87
germacreno A	-	-	-	-	-	-	26,45	1501	0,52
δ-cadineno	-	-	-	26,82	1510	0,53	-	-	-
Δ-cadineno	-	-	-	-	-	-	27,20	1520	1,76
elemol	-	-	-	-	-	-	28,19	1546	2,97
M = 204	-	-	-	-	-	-	29,16	1571	0,92
óxido de cariofileno	-	-	-	29,42	1578	0,59	-	-	-

¹t_R = tempo de retenção (minutos); ²IR = índice de retenção; n.i. = não identificado.

Composição do óleo essencial de citronela. O óleo essencial de citronela continha citronelal (40,8%), citrônolol (13,8%) e geraniol (25,7%; Tabela 13).

Composições parecidas já foram descritas, contendo 36,2% de citronelal, 18,4% de citrônolol e 11,6% de trans-geraniol (DUARTE et al., 2005) ou 34% de citronelal, 11,5% de citrônolol e 21,5% de geraniol (OUSSALAH et al, 2006). Marco et al. (2007) determinaram concentrações de 44,3% da mistura citronelal + citrônolol e 32% de geraniol.

Incubação de forragem. Nas duas doses, os três óleos de *Cymbopogon* sp. reduziram ($P < 0,05$) a produção de gás (mL), a produção de CH_4 (mL) e a DVMO (Tabela 14). Oh et al. (1967) observaram que o citronelal e o citrônolol reduziram em cerca de 30% a produção de gás *in vitro*. É importante considerar que esses efeitos negativos podem não ocorrer em condições *in vivo*. Mesmo para a MON, é comum observar reduções na degradação *in vitro* da MO (VAN NEVEL; DEMEYER, 1977; RUSSELL; STROBEL, 1989), fato comprovado neste experimento.

Como exemplo, 100 g/d de folhas secas e moídas de capim cidreira aumentaram a degradação aparente da MS em novilhos rebecendo dieta rica em volumoso, enquanto que doses de 200 e 300 g/d reduziram a degradação (WANAPAT et al., 2008). Também *in vivo*, 10 mL de óleo de eucalipto (50% de citronelal, 16% de 1,8-cineol e 10,5% de L-citrônolol) reduziram em 31% a produção de CH_4 , sem efeitos na digestibilidade e balanço de N em carneiros (SALLAM et al., 2009).

Houve decréscimo ($P < 0,05$) na produção de gás (mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$) em CID150, LIM150 e CIT150. Como discutido anteriormente, isto indiretamente sugere maior eficiência de síntese microbiana (MAKKAR, 2004). A produção de CH_4 , expressa em mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$, foi reduzida ($P < 0,05$) apenas no tratamento CID150 (35,6 e 10,3 mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$ para CTL e CID150, respectivamente).

As concentrações de AGCC totais e propionato foram menores ($P < 0,05$) para CID150, LIM150 e CIT150, enquanto a concentração de acetato foi reduzida ($P < 0,05$) em CID150 e LIM150. Para CID, LIM e CIT, a dose de 75 $\mu\text{L}/75 \text{ mL}$ diminuiu ($P < 0,05$) a concentração de propionato sem efeito sobre a concentração de acetato. Isto sugere que nestas doses os óleos foram mais efetivos sobre as bactérias produtoras de propionato (em geral gram-negativas).

Tabela 14 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina, Capim Cidreira (*C. citratus*), Capim Limão (*C. flexuosus*) e Citronela (*C. winterianus*) em 24 h de fermentação *in vitro* do feno de Coastcross

Item ¹	Tratamentos ²								EPM ³
	CTL	MON	C. Cidreira (CID)		C. Limão (LIM)		Citronela (CIT)		
			75	150	75	150	75	150	
Gás, mL	51,6	40,2*	30,2*	14,2*	28,6*	14,0*	20,3*	15,3*	2,50
Gás, mL/g MO _{degrad}	255,0	234,6	225,8	159,7*	269,2	167,6*	226,8	176,2*	23,07
CH ₄ , mL	7,2	5,1	3,8*	0,9*	4,0*	1,4*	3,2*	1,5*	0,78
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	35,6	29,8	28,8	10,3*	38,0	17,4	35,7	17,2	6,48
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	14,1	12,6	12,7	6,1	13,5	9,5	15,5	10,0	2,41
DVMO, %	48,1	40,6*	32,4*	21,2*	25,5*	20,0*	21,3*	20,7*	1,69
AGCC, mM									
Total	61,4	60,5	56,2	49,1*	56,0	44,5*	58,4	53,1*	4,31
Acetato	38,5	37,4	36,4	31,8*	36,8	29,2*	38,2	34,9	3,51
Propionato	12,1	13,3	9,6*	7,7*	9,1*	7,0*	10,1*	9,2*	0,88
Isobutirato	0,78	0,69	0,68	0,41*	0,67	0,36*	0,71	0,44*	0,049
Butirato	7,9	7,1	7,2	7,3	7,2	6,4*	7,2	6,9	0,45
Isovalerato	1,28	1,16	1,42	1,16	1,41	1,00	1,41	1,12	0,129
Valerato	0,81	0,86	0,90	0,67	0,84	0,54 [†]	0,88	0,66	0,070
C ₂ :C ₃	3,16	2,80	3,80*	4,11*	4,07*	4,17*	3,83*	3,82*	0,136

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = adição de monensina a 2,08 mg/L; Óleos essenciais de Capim Cidreira, Capim Limão e Citronela a 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Em geral, óleos essenciais promovem maior inibição em bactérias gram-positivas (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; BURT, 2004), mas seus efeitos sobre as gram-negativas também são conhecidos (GRIFFIN et al., 1999). A camada externa das gram-negativas é rica em lipopolissacarídeos, o que promove proteção extra contra várias substâncias (RUSSELL, 2002), incluindo óleos essenciais e ionóforos. Naik et al. (2010) demonstraram que bactérias gram-positivas foram mais sensíveis ao óleo essencial de capim cidreira do que as gram-negativas, o que contraria a ideia aqui levantada.

Como as principais bactérias produtoras de propionato são gram-negativas, tudo leva a crer que os óleos de *Cymbopogon* sp. causaram maior inibição nestas do que sobre as gram-positivas. Já se demonstrou eficácia do óleo essencial de citronela contra 6 de 13 sorotipos de *E. coli* (gram-negativa) que foram testados, sendo sua propriedade antimicrobiana principalmente atribuída ao geraniol (DUARTE et al., 2007). Mesmo assim, a hipótese de que os óleos foram mais efetivos contra bactérias gram-negativas deve ser vista com cautela, pois não há relação clara entre coloração gram e geração de acetato ou propionato como produtos finais (RUSSELL, 2002; DEHORITY, 2003).

Ao se levar em conta todos os efeitos combinados, podemos concluir que os óleos de *Cymbopogon* sp. possuem resultado fisiológico distinto de MON. Monensina altera as populações microbianas do rúmen causando aumento na produção de propionato e, como consequência, redução de CH₄ (RUSSELL; STROBEL, 1989). Em contrapartida, CID150 reduziu a produção de CH₄ (mL/g MO_{degradada}) mesmo com redução de propionato. Para este tratamento, o grau de redução na concentração de propionato (36% em relação ao CTL) foi maior do que para o acetato (17% em relação ao CTL). Portanto, pode-se inferir que, pelo menos para o óleo de capim cidreira, há provável efeito direto sobre as populações de *Archaea* metanogênicas. Este é um efeito possível, pois o óleo de alho, e alguns de seus componentes, reduz CH₄ por meio de ação direta sobre *Archaea* (BUSQUET et al., 2005bc; McALLISTER; NEWBOLD, 2008).

A concentração de isobutirato foi menor ($P < 0,05$) para CID150, LIM150 e CIT150. Proporcionalmente ao CTL, esta redução foi mais acentuada do que a verificada para a concentração total de AGCC, o que nos permite supor a possibilidade

de menor deaminação. Sob condições *in vivo*, o fornecimento diário de 100, 200 ou 300 g de folhas secas e moídas de capim cidreira reduziu linearmente a concentração ruminal de NH_3 e N-uréico plasmático, sem afetar a concentração total e as proporções molares de AGCC. Infelizmente a concentração de isoácidos não foi apresentada neste trabalho (WANAPAT et al., 2008).

Incubação da dieta de alto concentrado. Os efeitos dos óleos essenciais de *Cymbopogon* sp. sobre a fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado estão na Tabela 15. Os óleos de *Cymbopogon* sp. apresentaram produções de gás e CH_4 (mL e mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$) similares em relação ao CTL. Todavia, alguns tratamentos tiveram valores numéricos de CH_4 similares à MON (19,8; 17,8 e 18,5 mL/g $\text{MO}_{\text{degradada}}$ para MON, LIM150 e CIT150, respectivamente). A relação CH_4 :Gás foi menor ($P < 0,05$) para LIM150 e CIT150 em comparação ao CTL. Estes resultados indicam que a metanogênese foi mais afetada do que a degradação de substrato. A DVMO decresceu ($P < 0,05$) em MON e em todos os tratamentos contendo óleos essenciais. Contudo, observa-se que a redução na DVMO foi muito menor para a condição de alto concentrado do que para a condição de forragem.

Não houve diferenças na concentração total de AGCC, mas CID75 e LIM75 tiveram aumento ($P < 0,05$) de concentração de acetato, com tendência ($P < 0,10$) de aumento para CID150. A concentração de propionato não sofreu influência dos óleos essenciais. Em relação aos outros AGCC, apenas efeitos marginais foram encontrados. Não foram detectadas diferenças sobre a relação C_2 : C_3 . Em 4 h de incubação *in vitro*, o óleo de citronela e de capim-limão (10 ou 100 mg/L) não foram capazes de alterar as concentrações de acetato, propionato ou butirato (HRISTOV et al., 2008).

A concentração total de AGCC foi numericamente superior para CID75 e LIM75 em comparação ao CTL (106,8; 107,7 e 95,6 para CID75, LIM75 e CTL, respectivamente). Por outro lado, a DVMO foi reduzida ($P < 0,05$) nesses tratamentos. Como AGCC são produtos finais da fermentação (RUSSELL, 2002), é bastante intrigante o aumento numérico na concentração total de AGCC juntamente com menor ($P < 0,05$) degradação. Os dados de AGCC não foram corrigidos para os respectivos brancos, o que nos permite hipotetizar que o aumento de acetato foi causado pela degradação dos óleos essenciais.

Tabela 15 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina, Capim Cidreira (*C. citratus*), Capim Limão (*C. flexuosus*) e Citronela (*C. winterianus*) em 16 h de fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado

Item ¹	Tratamentos ²								EPM ³
	CTL	MON	C. Cidreira (CID)		C. Limão (LIM)		Citronela (CIT)		
			75	150	75	150	75	150	
Gás, mL	73,5	61,3	69,9	70,4	69,7	62,4	70,7	72,5	4,82
Gás, mL/g MO _{degrad}	217,0	197,0	221,8	225,0	225,2	198,6	228,5	231,8	17,12
CH ₄ , mL	9,3	6,1	10,4	7,4	9,2	5,6	8,3	5,8	1,59
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	27,7	19,8	33,13	23,6	29,7	17,8	26,9	18,5	5,32
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	12,6	9,9	14,9	10,4	12,8	8,4*	11,8	8,0*	1,66
DVMO, %	78,8	72,4*	73,2*	72,6*	72,0*	73,0*	72,0*	72,5*	1,09
AGCC, mM									
Total	95,6	100,9	106,8	97,4	107,7	86,1	102,6	91,3	11,03
Acetato	54,3	57,7	62,6*	61,0 [†]	63,9*	53,8	57,7	51,8	5,36
Propionato	18,0	22,4	21,1	15,6	20,6	14,4	21,5	19,5	3,38
Isobutirato	1,56	1,40	1,73	1,01*	1,67	0,84*	1,62	1,11 [†]	0,318
Butirato	16,2	14,5	15,2	14,9	15,2	12,5*	15,4	13,3	1,78
Isovalerato	3,07	2,68	3,72	2,73	3,73	2,39	3,45	2,57	0,518
Valerato	2,43	2,15	2,42	2,23	2,54	2,06	2,89	2,95	0,825
C ₂ :C ₃	3,06	2,58	3,01	4,20	3,14	4,23	2,75	3,05	0,476
pH	6,55	6,52	6,53	6,50	6,58	6,50	6,56	6,57	0,086

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleos essenciais de Capim Cidreira, Capim Limão e Citronela a 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Até o momento, os efeitos da degradação dos óleos essenciais sobre os produtos finais da fermentação ruminal *in vitro* (CO₂, AGCC, CH₄, etc), assim como os possíveis erros de interpretação derivados desse processo, foram negligenciados pela literatura científica. Como foram adicionados 500 mg de substrato por garrafa, consideramos que a suposta degradação de 75 ou 150 µL de óleo essencial possa causar impacto importante (densidade aprox. 0,85-0,90 g/mL).

Terpenos podem ser extensivamente degradados em apenas 3 h de incubação ruminal *in vitro* (MALECKY; BROUDISCOU, 2009) assim como em condições *in vivo* (MALECKY; BROUDISCOU; SCHMIDELY, 2009). Como exemplo, já foi observada a degradação ruminal do β-mirceno (BROUDISCOU; CORNU; ROUZEAU, 2007), que representou 16% do óleo de capim cidreira aqui utilizado (Tabela 13).

Ao considerarmos a produção total de gás (16 h) não corrigida para os brancos, CID75 e CL75 geraram numericamente mais gás do que o CTL (170; 176 e 166 mL para CID75, CL75 e CTL, respectivamente; dados não apresentados), o que não condiz com a queda significativa na DVMO. Por ação microbiana, monoterpênos podem ser biotransformados em monoterpênos semelhantes, tanto em condições anaeróbicas (HARDER; PROBIAN, 1995), aeróbicas (MARÓSTICA JR.; PASTORE, 2007), como ruminais (CHIZZOLA; HOCHSTEINER; HAJEK, 2004). Adicionalmente, já foi observada formação de gás durante a biotransformação anaeróbica (HARDER; PROBIAN, 1995) ou aeróbica (MISRA; PAVLOSTAHIS, 1997) de vários tipos de monoterpênos.

A degradação de citrônolol, citrônolal, geraniol e geranial por *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria encontrada no solo) ocorre por via metabólica semelhante ao inverso da β-oxidação, com produção de acetato e acetil-CoA (HÖSCHLE; GNAU; JENDROSSEK, 2005; FÖRSTER-FROMME; CHATTOPADHYAY; JENDROSSEK, 2008). Vias metabólicas reversas à β-oxidação ocorrem no ambiente ruminal, sendo utilizadas na formação de ácido valérico e capróico (RUSSELL, 2002). Como exemplo, a enzima acil-CoA desidrogenase, necessária para o início do processo de β-oxidação, está presente na bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* (BECKER et al., 1993). Portanto, ao unir estas informações concluímos que existe a possibilidade de produção de gás e acetato devido à degradação desses óleos essenciais por microrganismos ruminais. Tal hipótese, contudo, ainda necessitará de confirmação.

5.3.5 Ensaio com óleos essenciais de macela, guaco, carqueja e arnica

Composição do óleo essencial de macela. Os principais compostos encontrados no óleo essencial de macela foram trans-cariofileno (41,5%), α -pineno (25,5%), α -humuleno (6,2%) e Δ -cadineno (5,4%; Tabela 16). Plantas cultivadas na Argentina apresentaram composição bem distinta, com 39,7% de E-cariofileno, 14,2% de α -copaeno, 9,4% de δ -cadineno e 3,2% de α -muurulol (GILLIJ; GLEISER; ZYGADLO, 2008).

Composição do óleo essencial de guaco. O óleo essencial de guaco apresentou 32,7% de safrol, 9,8% de trans-cariofileno, 9,8% de 1,8-cineol e 6,8% de germacreno-D (Tabela 16). Rehder, Sartoratto e Rodrigues (2006) identificaram no óleo essencial de folhas de guaco germacreno-D (23,4%), β -cariofileno (21,3%), biciclogermacreno (11,4%) e δ -elemeno (9,9%). Por sua vez, Duarte et al. (2005) encontraram 41,5% de germacreno-D, 14,5% de trans-cariofileno e 9,8% de biciclogermacreno.

Composição do óleo essencial de carqueja. Os principais compostos do óleo essencial de carqueja foram: um composto não-identificado de massa molecular 192 (49,5%), β -pineno (17,2%) e limoneno (7,6%; Tabela 16). Simões-Pires et al. (2005) encontraram grande variação na composição do óleo essencial de *Baccharis cylindrica* (*B. crispa*, sinomínia) em função do mês de colheita e local de cultivo. Porém, os principais compostos foram o espatulenol (2,9 a 54,2%), o globulol (3 a 30%), o epiglobulol (0,5 a 18,9%) e o α -salineno (1,3 a 24,7%).

Análise do óleo essencial de *B. trimera* extraído por fluido supercrítico demonstrou que seus principais componentes foram o carquejil acetato, δ -cadineno, germacreno, palustrol, d-limoneno e β -eudesmol (VARGAS et al., 2006). Já Pocá (2005) identificou em *B. trimera* o indano (variação de 52,5 a 69,5%), o β -pineno (8,3 a 14,21%) e o espatulenol (8,5 a 10,0%). Concentração de espatulenol de até 28,5% foi encontrada por Silva et al. (2006) em *B. trimera*. Por fim, determinou-se grande variação na composição do óleo essencial de quatro espécies de carqueja cultivadas na Argentina, sendo encontrados principalmente o espatulenol, o β -pineno, o óxido de cariofileno, o germacreno e o limoneno (RETTA et al., 2009).

Tabela 16 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes nos óleos essenciais de Macela (*A. satureoides*), Guaco (*M. glomerata*), Carqueja (*B. cylindrica*) e Arnica (*L. pinaster*)

(continua)

[illegible]

Tabela 16 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes nos óleos essenciais de Macela (*A. saturooides*), Guaco (*M. glomerata*), Carqueja (*B. cylindrica*) e Arnica (*L. pinaster*)

(conclusão)

Compostos	Macela			Guaco			Carqueja			Arnica		
	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa
α-humuleno	24,41	1450	6,15	24,39	1450	1,43	-	-	-	-	-	-
dehidroaromadendrano	24,68	1457	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-gurjuneno	25,35	1473	1,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-muuroleno	-	-	-	-	-	-	25,51	1477	3,10	-	-	-
germacreno D	-	-	-	25,52	1478	6,79	-	-	-	-	-	-
β-selineno	-	-	-	25,71	1482	1,60	-	-	-	-	-	-
cis-β-guaieno	26,07	1491	2,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
biciclogermacreno	-	-	-	-	-	-	26,12	1493	2,71	-	-	-
α-selineno	-	-	-	26,12	1492	2,90	-	-	-	-	-	-
n.i.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,80	1510	6,11
δ-cadineno	26,82	1510	1,26	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Δ-cadineno	27,21	1521	5,39	27,20	1520	2,99	27,20	1520	0,88	-	-	-
n.i.	-	-	-	27,60	1531	1,34	-	-	-	-	-	-
n.i.	-	-	-	27,84	1537	1,17	-	-	-	-	-	-
α-calacoreno	-	-	-	27,93	1539	1,41	-	-	-	-	-	-
germacreno B	-	-	-	28,43	1552	3,37	-	-	-	-	-	-
ledol	-	-	-	-	-	-	28,84	1563	3,69	-	-	-
M = 220	-	-	-	-	-	-	29,23	1573	2,18	-	-	-
espatulenol	-	-	-	-	-	-	29,42	1578	1,63	-	-	-
óxido de cariofileno	29,42	1578	2,37	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	-	-	-	-	-	-	29,75	1587	1,41	-	-	-
M = 222	-	-	-	-	-	-	30,17	1598	0,69	-	-	-
M = 218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31,96	1647	2,16

¹t_R = tempo de retenção (minutos); ²IR = índice de retenção; ³n.i. = não identificado.

Composição do óleo essencial de arnica. β -pineno (63,7%) e α -pineno (14,9%) foram os principais compostos do óleo essencial de arnica (Tabela 16). Grande é a variação encontrada na literatura. Segundo Haber (2008), óleo de arnica é rico em trans-cinamato de metila e trans-cariofileno, com concentrações de 51,2 e 15,4%, respectivamente. Em outra espécie de arnica (*L. ericoides*), Curado et al. (2006) identificaram o α -bisabolol, o α -cadino e o *E*-nerolidol como constituintes principais. Lyra et al. (2008) também observaram que o α -bisabolol foi o composto majoritário da *L. ericoides*.

Incubação de forragem. Houve redução ($P < 0,05$) na produção de gás (mL) com ambas as doses de guaco, carqueja e arnica, com tendência ($P < 0,10$) de redução para MAC150 (Tabela 17). Todos os tratamentos, inclusive MON, apresentaram redução ($P < 0,05$) na DVMS em comparação ao CTL. O β -pineno e α -pineno representaram 78,5% do óleo de arnica, 18,5% do óleo de carqueja e 26,6% do óleo de macela (Tabela 16). Crane, Nelson e Brown (1957) observaram que doses crescentes de α -pineno inibiram progressivamente a fermentação ruminal *in vitro* da celulose.

A produção de gás, expressa em mL/g MS_{degradada}, foi menor para ARN150, o que indiretamente demonstra benefícios sobre a eficiência de síntese microbiana (MAKKAR, 2004). Os tratamentos GUA150, CAR150, ARN75 e ARN150 reduziram ($P < 0,05$) a produção de CH₄ (mL) em relação ao CTL. Ao se expressar a produção de CH₄ em mL/g MO_{degradada}, verificou-se tendência de redução ($P < 0,10$) apenas em ARN150. A relação CH₄:Gás não foi afetada em nenhum dos tratamentos.

A concentração total de AGCC foi menor ($P < 0,05$) em GUA150 e ARN150, com tendência ($P < 0,10$) de redução para ARN75. Seguindo este padrão, a concentração de acetato reduziu ($P < 0,05$) em GUA150, ARN75 e ARN150, com tendência de redução ($P < 0,10$) para CAR150. Somente MON aumentou ($P < 0,05$) a concentração de propionato, sendo que GUA150, CAR75, CAR150, ARN75 e ARN150 apresentaram redução ($P < 0,05$) nesta variável. De modo geral, as quedas verificadas nas concentrações de AGCC foram resultado direto da menor DVMS observada com a inclusão dos óleos essenciais.

Tabela 17 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina, Macela (*A. saturoides*), Guaco (*M. glomerata*), Carqueja (*B. cylindrica*) e Arnica (*L. pinaster*) em 24 h de fermentação *in vitro* do feno de Coastcross

Item ¹	Tratamentos ²										EPM ³
	CTL	MON	Macela		Guaco		Carqueja		Arnica		
			75	150	75	150	75	150	75	150	
Gás, mL	57,4	47,0*	51,0	49,9 [†]	47,0*	30,2*	43,7*	25,3*	29,0*	19,3*	2,20
Gás, mL/g MS _{degrad}	234,4	220,1	259,9	259,1	250,2	226,7	242,8	204,2	237,0	163,5*	15,88
CH ₄ , mL	7,3	5,6*	7,0	6,8	6,1	3,8*	5,8	3,6*	4,0*	2,5*	0,44
CH ₄ , mL/g MS _{degrad}	29,9	26,2	35,8	35,2	32,4	28,9	32,4	29,2	32,3	21,1 [†]	2,47
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	12,8	12,0	13,9	13,6	13,0	12,8	13,3	14,6	14,3	13,2	1,46
DVMS, %	53,2	46,3*	42,6*	41,9*	40,7*	28,9*	39,1*	26,8*	26,9*	25,7*	1,01
AGCC, mM											
Total	69,9	68,6	68,4	65,4	64,0	57,3*	64,1	61,4	60,2 [†]	55,8*	5,88
Acetato	46,8	45,3	45,6	43,7	42,6	37,1*	41,8	39,5 [†]	39,2*	36,7*	4,67
Propionato	12,1	13,4*	11,9	11,2	11,0 [†]	10,1*	10,7*	9,9*	10,3*	9,9*	0,79
Isobutirato	0,80	0,69	0,80	0,78	0,79	0,75	0,76	0,66	0,75	0,57*	0,085
Butirato	8,1	7,2	8,0	7,7	7,4	7,1	8,7	9,1	7,7	6,9	0,90
Isovalerato	1,26	1,13	1,31	1,28	1,27	1,32	1,32	1,23	1,31	1,07	0,197
Valerato	0,84	0,92	0,84	0,85	0,87	0,91	0,85	0,91	0,99	0,82	0,081
C ₂ :C ₃	3,84	3,38 [†]	3,81	3,91	3,84	3,66	3,92	4,01	3,83	3,73	0,326

¹DVMS = degradação verdadeira da matéria seca; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleos essenciais de Macela, Guaco, Carqueja e Arnica a 75 e 150 µL em 75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Todos os outros AGCC não foram afetados pelos tratamentos. A única exceção foi a menor ($P < 0,05$) concentração de isobutirato para ARN150. A relação $C_2:C_3$ não foi alterada pelos óleos essenciais, apresentando tendência ($P < 0,10$) de redução para MON.

Ao se incubar forragem, somente o óleo essencial de arnica apresentou efeitos positivos, a exemplo da menor produção de gás e tendência de redução de CH_4 quando ambas foram expressas em mL/g $MO_{degradada}$. Não houve aumento na produção de propionato ou diminuição da relação $C_2:C_3$, indicando provável efeito direto sobre os microrganismos metanogênicos. Os óleos de guaco e carqueja apresentaram atividade antimicrobiana sem alterações positivas na fermentação. Por fim, o óleo de macela mostrou somente efeitos marginais.

Incubação da dieta de alto concentrado. Os efeitos dos óleos de guaco, carqueja e arnica sobre a fermentação da dieta de alto concentrado estão na Tabela 18.

A produção de gás (mL) e a DVMO foram menores ($P < 0,05$) para GUA150, CAR75, CAR150, ARN75 e ARN150. Como constatado para os óleos de aroeira e *Cymbopogon* sp., a ação antimicrobiana de guaco, carqueja e arnica foi mais potente ao se incubar forragem do que ao se incubar dieta de alto concentrado. Isto pode ser sobretudo evidenciado pela redução mais acentuada na DVMO ao se incubar feno em relação à incubação de alto concentrado. Porém, os câmbios de fermentação foram mais promissores para alto concentrado.

Estas diferenças na DVMO são atribuídas tanto ao inóculo (alto concentrado vs pastagem) como ao substrato utilizado (dieta de alto concentrado vs feno). Sabe-se que a dieta oferecida ao ruminante afeta profundamente as populações microbianas do rúmen (KOCHERGINSKAYA; AMINOV; WHITE, 2001). Assim, a melhor estratégia em experimentos *in vitro* é utilizar inóculo que seja adaptado ao alimento a ser incubado.

Da mesma forma, o efeito de óleos essenciais pode ser alterado pelo tipo de substrato. Ao utilizarem um único tipo de inóculo, Crane, Nelson e Brown (1957) observaram que o α -pineno puro (presente em 63,7% no óleo de arnica e 17,2% do óleo de carqueja) reduziu a fermentação ruminal *in vitro* da celulose, sem efeitos inibitórios sobre a fermentação de amido e celobiose. Apenas doses elevadas de α -pineno foram capazes de reduzir a degradação do amido.

Tabela 18 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina, Macela (*A. saturoides*), Guaco (*M. glomerata*), Carqueja (*B. cylindrica*) e Arnica (*L. pinaster*) em 16 h de fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado

Item ¹	Tratamentos ²										EPM ³
	CTL	MON	Macela		Guaco		Carqueja		Arnica		
			75	150	75	150	75	150	75	150	
Gás, mL	78,7	61,2*	77,4	72,7	70,4	64,6*	67,2*	66,5*	66,8*	70,9	4,27
Gás, mL/g MO _{degrad}	230,8	193,8*	238,1	223,6	225,1	213,0	220,1	229,6	224,8	227,6	10,70
CH ₄ , mL	10,9	7,0*	13,9*	10,5	9,5	7,9*	9,1	7,7*	5,8*	6,5*	1,00
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	32,0	21,6*	42,7*	31,8	30,3	25,9	29,6	26,9	20,4*	21,2*	2,67
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	13,4	11,2	17,1 [†]	13,9	13,1	11,9	13,4	11,1	8,9*	8,9*	1,05
DVMO, %	79,1	73,4	75,2	75,5	72,3 [†]	70,2*	70,9*	67,2*	69,2*	72,1*	2,57
AGCC, mM											
Total	88,1	83,2	88,2	91,6	89,9	92,3	92,8	96,1 [†]	95,9 [†]	93,7	4,41
Acetato	48,5	44,5	47,6	46,9	44,6	45,1	51,1	54,0	51,5	47,7	3,73
Propionato	17,7	21,0*	19,0	19,5	20,3*	21,0*	20,1*	21,2*	24,0*	25,2*	1,76
Isobutirato	1,27	1,00 [†]	1,31	1,40	1,40	1,17	1,26	0,89*	1,15	0,95*	0,099
Butirato	15,5	12,7*	15,0	15,1	16,4	16,8	15,7	15,5	14,1	13,2*	0,67
Isovalerato	2,76	2,21	2,84	2,97	2,99	2,59	3,34	3,19	3,01	2,31	0,238
Valerato	1,33	1,23	1,41	1,52	1,62	1,82*	1,63	1,65	1,99*	1,99*	0,140
C ₂ :C ₃	2,84	2,17*	2,61	2,60	2,46*	2,37*	2,54	2,54	2,12*	1,95*	0,142
pH	6,47	6,51	6,45	6,45	6,51	6,50	6,46	6,46	6,47	6,47	0,053

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = Monensina a 2,08 mg/L; Óleos essenciais de Macela, Guaco, Carqueja e Arnica a 75 e 150 µL/75 mL fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Por fim, é significativa a quantidade de MS incubada oriunda do inóculo. Em nossas condições, o inóculo incubado traz consigo entre 500 a 750 mg (25 mL de inóculo contendo 2-3% de MS). Logo, utilizar inóculo adaptado assegura que a MS do inóculo seja semelhante a do substrato.

MON reduziu ($P < 0,05$) a produção de gás expressa em mL/g $MO_{degradada}$, não havendo efeito nos tratamentos contendo óleos essenciais. A produção de CH_4 (mL) foi menor ($P < 0,05$) em GUA150, CAR150, ARN75 e ARN150. Apenas os dois tratamentos contendo arnica e MON apresentaram menores ($P < 0,05$) produções de CH_4 quando expressas em mL/g $MO_{degradada}$. O óleo essencial de macela aumentou ($P < 0,05$) a produção de CH_4 , tanto expressa em mL como em mL/g $MO_{degradada}$, com tendência de aumento ($P < 0,10$) para a relação CH_4 :Gás.

O óleo essencial de arnica apresentava 63,7% de β -pineno (Tabela 16). Já foi documentado que óleo de zimbro (*Juniperus communis*; 35% α -pineno; 20 mg/L) reduziu a produção total de CH_4 , assim como a produção de CH_4 expressa em relação ao total de AGCC produzido (CHAVES et al., 2008a). Em estudo de microbiologia molecular, verificou-se que o óleo de zimbro (*Juniperus communis*; 25% mirceno, 18% citronelol e 14% α -pineno) não alterou o número total de cópias do 16S rRNA microbiano, embora com tendência de aumento sobre a diversidade das populações de *Archaea* (OHNE-ADJEI et al., 2008).

A concentração de AGCC apresentou tendência de aumento ($P < 0,10$) para CAR150 e ARN75. Não houve efeito sobre acetato, sendo que propionato foi maior ($P < 0,05$) para MON e em ambas as doses de guaco, carqueja e arnica. Em experimento *in vivo*, Chaves et al. (2008b) discutiram que o óleo de zimbro contendo 35% de α -pineno (isômero do β -pineno) aumentou numericamente a concentração de AGCC (81,0 vs 101,6 mM) e a proporção molar de propionato (29,5 vs 35,8 mol/100 mol), havendo inclusive melhora significativa no GMD. Por outro lado, 2 g/d de óleo de zimbro fornecidos para vacas em lactação não alteraram o perfil ruminal de AGCC, assim como a produção e a composição do leite (YANG et al., 2007). A adição de β -pineno a *pellets* de alfafa não interferiu no CMS de cordeiros (ESTELL et al., 2002). Todavia, sabe-se que α -pineno pode reduzir o CMS (ESTELL et al., 1998).

Os tratamentos MON, GUA75, GUA150, ARN75 e ARN150 tiveram diminuição ($P < 0,05$) na relação $C_2:C_3$, fato explicado pela maior concentração de propionato. Busquet et al. (2005a), em sistema *in vitro* de fluxo contínuo, constataram que o óleo de cade (*Juniperus oxycedrus*; 35% de α -pineno; 2,2 mg/L ou 75 mg/kg MS) reduziu $C_2:C_3$.

Como discutido para as plantas do gênero *Cymbopogon* sp., não podemos aqui desconsiderar que a degradação ruminal dos óleos essenciais possa ter causado o aumento de propionato. O óleo essencial de arnica continha 63,7% de β -pineno (Tabela 16). A degradação de α -pineno e β -pineno por microrganismos ruminais já foi descrita na literatura (BROUDISCOU; CORNU; ROUZEAU, 2007; MALECKY; BROUDISCOU, 2009; MALECKY; BROUDISCOU; SCHMIDELY, 2009). Da mesma forma, a inclusão de α -pineno, β -pineno e limoneno aumentou a produção de gás *in vitro* (OH et al., 1967), o que permite supor que possa ter ocorrido degradação desses compostos. A degradação do óxido de α -pineno por *Pseudomonas fluorescens*, uma bactéria encontrada no solo, ocorre por via metabólica semelhante ao inverso da β -oxidação, com consumo de H^+ e formação de propionil-CoA durante as reações intermediárias (ZORN; NEUSER; BERGER, 2004). Em contrapartida, pelo menos para o óleo de arnica, o aumento de propionato está de acordo com a menor produção de CH_4 (mL/g $MO_{degradado}$) e menor CH_4 :Gás. *In vitro*, Meale et al. (2010) verificaram que 250 e 400 mg/L de óleo de zimbro aumentaram a concentração total de AGCC. Os autores encaram este fato como positivo, mas supomos que ele possa estar relacionado à degradação do óleo de zimbro. Infelizmente, os autores não apresentam os dados de degradação do substrato.

As concentrações de isobutirato e butirato foram menores ($P < 0,05$) em ARN150 em comparação ao CTL. A concentração de valerato foi maior ($P < 0,05$) para GUA150, ARN75 e ARN150. Valerato é produzido pela condensação de acetil-CoA e propionil-CoA (RUSSELL, 2002), mas não sabemos as causas desse aumento. Talvez a produção de propionil-CoA oriunda da possível degradação dos óleos essenciais seja a responsável por esse aumento.

Em relação aos outros terpenos presentes nos óleos essenciais de macela, guaco, carqueja e arnica, já foram estudados os efeitos ruminais de limoneno e 1,8-cineol. O limoneno (presente em 13% no óleo de aroeira-folhas) na dose *in vitro* de 5000 mg/L foi capaz de reduzir a concentração total de AGCC, a proporção de acetato

e a relação C₂:C₃ (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006). Ciclodextrinas de cineol pouco afetaram a fermentação *in vitro*, inclusive com aumento na produção de CH₄ (TATSUOKA et al., 2008). Ao se fornecer 10 mL de óleo de eucalipto (50% de citronelal, 16% de 1,8-cineol e 10,5% de L-citronelol) houve 31% de redução de CH₄, sem efeitos sobre digestibilidade e balanço de N em carneiros (SALLAM et al., 2009).

5.3.6 Ensaio com óleos resinóides de copaíba mari-mari, copaíba angelim, copaíba zoró e copaíba vermelha

Composição dos óleos resinóides. O óleo de copaíba mari-mari (*Copaifera reticulata*) apresentou 50,2% de trans-cariofileno, 8,1% de α -humuleno, 7,45% de α -copaeno e 6,2% de α -trans-bergamoteno. O óleo de copaíba angelim (*C. multijuga*) continha 78,7% de um composto não identificado de massa molecular 330. Por fim, as frações voláteis de copaíba zoró e copaíba vermelha (*Copaifera langsdorfii*) apresentaram 21,9 e 56,5% de trans-cariofileno, 11,4 e 0% de α -trans-bergamoteno, 9,1 e 0% de β -bisaboleno, e 8,6 e 5,9% de α -copaeno, respectivamente (Tabela 19).

Em *C. reticulata* já se encontrou 37,5% de trans- β -cariofileno e 5,2% de aromadendreno (GOMES et al., 2007). Em outro estudo, *C. reticulata* apresentou concentração anual de β -cariofileno entre 39 e 61,8% para um espécime e entre 25,1 e 50,2% para outro exemplar (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2006).

No caso da *C. multijuga*, já foram documentados teores de 68,4% de trans- β -cariofileno, 9,1% de aromadendreno e 6,9% de α -bergamoteno (GOMES et al., 2007). Em outra pesquisa, amostras distintas do óleo-resina de *C. multijuga* apresentaram 60,3 e 42,9% de trans- β -cariofileno (CASCON; GILBERT, 2000).

Incubação de forragem. Os óleos das copaíbas pouco afetaram a fermentação ruminal (Tabela 20). Houve redução ($P < 0,05$) na produção de gás (mL) apenas para ANG150 e MON. O tratamento MARI150 foi o único a apresentar aumento ($P < 0,05$) na produção de gás quando expressa em mL/g MO_{degradada}. Nenhum dos tratamentos com óleos alterou a produção de CH₄ (mL ou mL/g MO_{degradada}) ou a relação CH₄:Gás.

As concentrações de AGCC totais e acetato foram maiores ($P < 0,05$) somente para ZORO75. Apenas MON aumentou ($P < 0,05$) a concentração de propionato.

Tabela 19 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes nos óleos resinóides das Copaíbas Mari-Mari (*C. reticulata*), Zoró (*C. langsdorfii*), Angelim (*C. multijuga*) e Vermelha (*C. langsdorfii*)

(continua)

Compostos	Copaíba mari-mari			Copaíba angelim			Copaíba zoró			Copaíba vermelha		
	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa
Δ-elemenno	19,73	1335	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-cubebeno	20,33	1350	0,97	-	-	-	20,23	1347	1,42	20,23	1347	0,78
α-copaeno	21,34	1374	7,39	21,29	1373	2,03	21,34	1374	8,58	21,33	1374	5,89
β-cubebeno	-	-	-	-	-	-	21,91	1388	0,85	-	-	-
β-elemenno	21,99	1390	2,24	-	-	-	21,98	1390	0,96	21,99	1390	1,61
trans-cariofileno	23,28	1422	50,20	23,06	1416	4,26	23,17	1419	21,87	23,31	1422	56,54
α-trans-bergamoteno	23,81	1435	6,23	23,76	1434	2,86	23,83	1435	11,41	23,80	1435	4,70
α-humuleno	24,49	1452	8,08	24,40	1450	0,59	24,45	1451	3,19	24,50	1452	9,43
<E> beta-farneseno	-	-	-	-	-	-	24,66	1456	1,41	-	-	-
dehidro aromadendreno	24,72	1458	0,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
δ-muuroleno	25,39	1474	1,23	25,51	1477	1,03	25,40	1475	1,46	25,40	1475	1,88
germacreno D	25,55	1478	3,33	-	-	-	25,55	1478	5,16	25,55	1478	3,58
M = 204	25,70	1482	0,86	25,68	1482	0,39	25,71	1482	1,53	25,71	1482	0,94
biciclogermacreno	26,13	1493	0,72	-	-	-	26,14	1493	1,47	26,08	1492	1,00
α-bisaboleno	-	-	-	-	-	-	26,46	1501	1,09	-	-	-
β-bisaboleno	26,67	1507	1,07	26,67	1507	2,27	26,74	1508	9,10	26,68	1507	2,10
hidroxitolueno butilato	-	-	-	26,82	1510	0,70	-	-	-	-	-	-
M = 220	26,83	1511	1,87	-	-	-	26,85	1511	0,83	26,83	1511	1,06
Δ-cadineno	27,23	1521	2,76	27,21	1521	1,15	27,26	1522	4,92	27,24	1521	2,91
M = 204	-	-	-	-	-	-	28,00	1541	1,23	-	-	-
germacreno B	28,46	1553	2,79	-	-	-	28,44	1553	1,23	28,44	1553	0,66

Tabela 19 – Identificação por CG/EM dos compostos secundários presentes nos óleos resinóides das Copaíbas Mari-Mari (*C. reticulata*), Zoró (*C. langsdorfii*), Angelim (*C. multijuga*) e Vermelha (*C. langsdorfii*)

(conclusão)

Compostos	Copaíba mari-mari			Copaíba angelim			Copaíba zoró			Copaíba vermelha		
	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa	t _R ¹	IR ²	% relativa
cariofileno álcool	28,93	1565	0,82	-	-	-	-	-	-	28,92	1565	0,80
óxido de cariofileno	29,42	1578	0,49	-	-	-	-	-	-	29,44	1579	2,46
α-muurolol	31,81	1643	0,43	-	-	-	-	-	-	31,81	1643	0,65
M = 222	33,57	1691	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M = 262	-	-	-	42,99	1972	0,52	43,02	1973	2,29	-	-	-
n.i. ³	44,72	n.d. ⁴	2,47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
n.i.	45,37	n.d.	0,86	-	-	-	45,41	n.d.	0,97	-	-	-
n.i.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45,77	n.d.	0,57
M = 272	-	-	-	45,78	n.d.	0,55	45,80	n.d.	2,65	-	-	-
n.i.	-	-	-	-	-	-	50,24	n.d.	1,40	-	-	-
M = 320	-	-	-	-	-	-	50,41	n.d.	2,73	-	-	-
M = 320	-	-	-	-	-	-	50,50	n.d.	0,73	-	-	-
n.i.	51,21	n.d.	2,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M = 318	52,60	n.d.	0,64	52,62	n.d.	2,57	52,64	n.d.	3,83	52,60	n.d.	1,46
n.i.	53,73	n.d.	0,43	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M = 318	-	-	-	53,93	n.d.	1,49	53,98	n.d.	4,69	-	-	-
M = 330	-	-	-	-	-	-	56,00	n.d.	3,02	55,96	n.d.	0,97
M = 330	-	-	-	56,33	n.d.	78,67	-	-	-	-	-	-
M = 330	-	-	-	57,45	n.d.	0,93	-	-	-	-	-	-

¹t_R = tempo de retenção (minutos); ²IR = índice de retenção; ³n.i. = não identificado; ⁴n.d. = não determinado.

Tabela 20 – Efeitos dos tratamentos Controle, Monensina e Copaíbas Mari-Mari (*C. reticulata*), Angelim (*C. multijuga*), Zoró (*C. langsdorfii*) e Vermelha (*C. langsdorfii*) em 24 h de fermentação *in vitro* do feno de Coastcross

Item ¹	Tratamentos ²										EPM ³
	CTL	MON	C. Mari-Mari		C. Angelim		C. Zoró		C. Vermelha		
			75	150	75	150	75	150	75	150	
Gás, mL	59,8	44,9*	55,7	56,8	56,7	51,8*	60,9	57,5	58,3	56,2	2,49
Gás, mL/g MO _{degrad}	278,2	240,2	301,5	341,5*	285,3	290,1	291,9	266,1	290,5	326,2	17,67
CH ₄ , mL	7,9	5,2*	7,5	7,7	7,5	6,2	8,6	8,4	7,7	7,7	1,23
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	36,8	27,8	40,6	47,1	38,2	34,8	42,0	39,4	38,8	45,8	7,91
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	13,2	11,6	13,3	13,6	13,4	12,2	14,2	14,7	13,2	13,7	2,22
DVMO, %	50,7	43,9*	43,6*	39,9*	46,8	42,1*	49,5	50,8	47,3	41,3*	2,31
AGCC, mM											
Total	64,7	65,6	68,4	68,7	65,5	65,8	72,2*	66,2	66,3	67,4	4,59
Acetato	40,6	41,5	43,2	43,6	40,4	40,8	46,3*	41,5	41,5	42,5	3,68
Propionato	12,8	14,2*	13,4	13,3	13,3	13,3	13,7	13,1	13,1	13,0	0,85
Isobutirato	0,86	0,72*	0,88	0,89	0,92	0,90	0,92	0,86	0,89	0,91	0,078
Butirato	8,1	7,1*	8,4	8,4	8,4	8,3	8,7	8,4	8,4	8,4	0,56
Isovalerato	1,39	1,16*	1,49	1,52	1,52	1,50	1,52	1,43	1,48	1,56 [†]	0,128
Valerato	0,89	0,85	1,00	0,96	0,99	0,96	1,02	0,92	0,98	1,00	0,066
C ₂ :C ₃	3,17	2,87*	3,22	3,27	3,02	3,06	3,37	3,17	3,16	3,26	0,095

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = adição de monensina a 2,08 mg/L; Óleos resinóides de Copaíba Mari-Mari, Copaíba Angelim, Copaíba Zoró e Copaíba Vermelha a 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Em relação aos outros AGCC, somente VERM150 teve aumento ($P < 0,05$) na concentração de isovalerato. Como esperado, MON reduziu ($P < 0,05$) a relação $C_2:C_3$, sem que nenhum tratamento contendo óleos de copaíba tenha afetado esta variável.

A característica viscosa dos óleos resinóides pode ter dificultado a interação dos mesmos com o meio de incubação. Esta pode ser uma das explicações para a ausência de efeito dos óleos de copaíba. Nestes trabalhos, optou-se pela não utilização de solventes ou substâncias surfactantes que pudessem aumentar a interação dos óleos com a fase aquosa. Alcoóis, a exemplo do etanol, são degradados por microrganismos ruminais (CZERKAWSKI; BRECKENRIDGE, 1972). Da mesma forma, surfactantes (ex: Tween 80) afetam a fermentação, o que interferiria nos efeitos dos óleos essenciais (WANG; ALEXANDER; MCALLISTER, 2004).

Existem poucos estudos sobre os principais componentes dos óleos de copaíba em condições ruminais. Já foi relatada degradação *in vitro* de β -cariofileno e α -copaeno (BROUDISCOU; CORNU; ROUZEAU, 2007) e que doses crescentes de α -copaeno não alteraram o consumo de *pellets* de alfafa por cordeiros (ESTELL et al., 2005).

Incubação da dieta de alto concentrado. Os efeitos dos óleos de copaíba sobre a fermentação ruminal da ração de alto concentrado são apresentados na Tabela 21. Os óleos não afetaram a produção de gás (mL ou mL/g $MO_{degradada}$), a produção de CH_4 (mL ou mL/g $MO_{degradada}$), a relação CH_4 :Gás ou a DVMO.

Somente VERM150 aumentou ($P < 0,05$) a concentração de AGCC totais. A concentração de acetato não foi influenciada pelos tratamentos e a concentração de propionato foi maior ($P < 0,05$) para MARI150 e VERM150, com tendência ($P < 0,10$) de aumento para MARI75. De modo geral, os óleos de copaíba aumentaram a concentração de butirato, isobutirato e isovalerato, o que variou em função do tipo de óleo e da dose utilizada.

A degradação de β -cariofileno e α -copaeno, dois dos principais componentes dos óleos de copaíba, já foi descrita durante fermentação ruminal *in vitro* (BROUDISCOU; CORNU; ROUZEAU, 2007). Isto pode ter causado as maiores concentrações de AGCC verificadas em alguns casos. Todavia, não se sabe quais poderiam ser os produtos finais da degradação dos componentes do óleo de copaíba no rúmen.

Tabela 21 – Efeitos do Controle, Monensina e Copaibas Mari-Mari (*C. reticulata*), Angelim (*C. multijuga*), Zoró (*C. langsdorfii*) e Vermelha (*C. langsdorfii*) em 16 h de fermentação *in vitro* da dieta de alto concentrado

Item ¹	Tratamentos ²										EPM ³
	CTL	MON	C. Mari-Mari		C. Angelim		C. Zoró		C. Vermelha		
			75	150	75	150	75	150	75	150	
Gás, mL	79,9	73,2 [†]	77,7	76,3	76,6	76,8	78,0	76,5	80,4	77,1	3,50
Gás, mL/g MO _{degrad}	233,5	226,1	232,0	230,2	225,7	229,7	227,6	221,4	238,2	231,5	7,11
CH ₄ , mL	10,9	8,3 [†]	10,7	10,7	11,2	11,4	10,9	8,9	9,2	10,2	1,04
CH ₄ , mL/g MO _{degrad}	32,0	25,7	32,0	32,3	33,1	34,2	31,7	25,9	27,5	30,8	3,54
CH ₄ :Gás, mL/100 mL	13,7	11,4	13,7	14,0	14,7	14,8	13,9	11,7	11,5	13,2	1,31
DVMO, %	79,4	75,0*	77,9	77,0	78,7	77,5	79,6	80,1	78,4	77,3	2,57
AGCC, mM											
Total	87,0	86,4	90,6	90,7	91,4	91,5	86,7	86,2	90,2	94,5*	5,13
Acetato	47,7	46,6	49,7	48,8	50,1	49,9	45,8	47,0	49,4	52,2	2,53
Propionato	16,5	20,3*	17,6 [†]	17,9*	17,0	17,4	16,7	16,1	16,9	18,0*	1,37
Isobutirato	1,22	0,96*	1,25	1,32*	1,34*	1,31*	1,30*	1,23	1,28	1,31*	0,144
Butirato	17,4	15,3*	17,8	18,2	18,4*	18,3*	18,5*	17,7	18,4*	18,4*	1,63
Isovalerato	2,67	2,13*	2,72	2,90*	2,92*	2,96*	2,83 [†]	2,67	2,84*	2,92*	0,218
Valerato	1,51	1,23*	1,50	1,60	1,68	1,64	1,53	1,51	1,54	1,64	0,135
C ₂ :C ₃	2,93	2,32*	2,88	2,76	2,97	2,90	2,80	2,95	2,95	2,90	0,241
pH	6,75	6,70	6,66	6,61*	6,68	6,65	6,65	6,66	6,69	6,67	0,030

¹DVMO = degradação verdadeira da matéria orgânica; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = relação acetato:propionato.

²CTL = Controle; MON = adição de monensina a 2,08 mg/L; Óleos resinóides de Copaíba Mari-Mari, Copaíba Angelim, Copaíba Zoró e Copaíba Vermelha a 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado.

³EPM = erro padrão da média.

*Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,05$).

[†]Médias nas linhas diferem do tratamento Controle pelo teste de Dunnett ($P < 0,10$).

Isoácidos são usados como fatores de crescimento para bactérias celulolíticas (DEHORITY, 2003). Assim, a inibição das bactérias celulolíticas poderia significar menor consumo de isoácidos e, conseqüentemente, maior concentração dos mesmos ao final da incubação. Todavia, tal hipótese é descartada, já que não houve redução na DVMO. À exceção de MON, nenhum tratamento alterou a concentração de valerato e a relação $C_2:C_3$.

5.4 Conclusão

Os óleos essenciais de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) e macela (*Achyrocline satureoides*), assim como os óleos resinóides de copaíba mari-mari (*Copaifera reticulata*), copaíba angelim (*Copaifera multijuga*), copaíba zoró (*Copaifera langsdorfii*) e copaíba vermelha (*Copaifera langsdorfii*) apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre a fermentação ruminal *in vitro*.

Os óleos de aroeira vermelha (folhas e frutos; *Schinus terebinthifolius*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus*), capim limão (*Cymbopogon flexuosus*), citronela (*Cymbopogon winterianum*), guaco (*Mikania glomerata*), carqueja (*Baccharis cylindrica*) e arnica (*Lychnophora pinaster*) foram capazes de manipular a fermentação ruminal. De modo geral, todos reduziram a produção de gás e a degradação verdadeira da matéria orgânica, o que demonstra suas propriedades antimicrobianas em condições ruminais.

Foram identificadas alterações positivas ao se utilizar esses óleos essenciais. Ao se incubar forragem, a dose 2 $\mu\text{L/mL}$ de óleo essencial de capim-cidreira reduziu a produção de CH_4 quando expressa em $\text{mL/g MO}_{\text{degradada}}$. A mesma dose de capim limão ou citronela diminuiu a relação CH_4 :Gás na condição de alto concentrado. Todavia, em nenhum dos casos houve aumento na concentração de propionato ou redução na relação $C_2:C_3$, o que torna incerto seu sucesso sob condições *in vivo*.

Os resultados mais promissores foram observados ao se incubar dieta de alto concentrado. Nesta situação, os óleos essenciais de aroeira vermelha (folhas e frutos), guaco e arnica aumentaram a concentração de propionato e reduziram a relação acetato:propionato. O óleo de arnica foi capaz de diminuir a produção de CH_4 por unidade de substrato degradado.

Os óleos essenciais de aroeira vermelha extraídos das folhas e dos frutos e arnica apresentaram os resultados mais promissores. Assim sendo, a próxima etapa será a avaliação *in vivo* dessas substâncias.

Referências

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

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 2nd ed. Carol Stream: Allured Publ., 2001.

AGARWAL, N.; SHEKHAR, C.; KUMAR, R.; CHAUDHARY, L.C.; KAMRA, D.N. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 148, n. 2/4, p. 321-327, 2009.

ARAUJO, R.C.; PIRES, A.V.; ABDALLA, A.L.; PEÇANHA, M.R.S.R.; SALLAM, S.M.A. Monensina sódica como controle positivo para estudos sobre manipuladores da fermentação ruminal utilizando a técnica de produção de gás *in vitro*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Resumos...** Maringá: SBZ, 2009. 1 CD ROM.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 18th ed. Gaithersburg, 2006.

BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; CLEMENTE, A.D. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* RADDI. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARBOSA, L.C.A.; PEREIRA, U.A.; MARTINAZZO, A.P.; MALTHA, C.R.A.; TEIXEIRA, R.R.; MELO, E.C. Evaluation of the chemical composition of Brazilian commercial *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf samples. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 8, p. 1864-1874, 2008.

BECKER, D.F.; FUCHS, J.A.; BANFIELD, D.K.; FUNK, W.D.; MACGILLIVARY, R.T.A.; STANKOVICH, M.T. Characterization of wild-type and an active-site mutant in *Escherichia coli* of short-chain acyl-CoA dehydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. **Biochemistry**, Washington, v. 32, n. 40, p. 10736-10742, 1993.

BROUDISCOU, L.P.; CORNU, A.; ROUZEAU, A. *In vitro* degradation of 10 mono- and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro-organisms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 87, n. 9, p. 1653-1658, 2007.

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.; KAMEL, C. Screening for effects of plant extracts and active compounds on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123/124, n. 2, p. 597-613, 2005a.

_____. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 2, p. 761-771, 2006.

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

_____. 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, 2005c.

CALLAWAY, T.R.; EDRINGTON, T.S.; RYCHLIK, J.L.; GENOVESE, K.J.; POOLE, T.L.; JUNG, Y.S.; BISCHOFF, K.M.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 4, n. 1, p. 43-51, 2003.

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

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

CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.

CARVALHO JR., P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 95, n. 2/3, p. 297-301, 2004.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 55, n. 7, p. 773-778, 2000.

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

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

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

CHAVES, A.V.; STANFORD, K.; DUNGAN, M.E.R.; GIBSON, L.L.; McALLISTER, T.A.; VAN HERK, F.; BENCHAAR, 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**, Amsterdam, v. 117, n. 2/3, p. 215-224, 2008b.

CHEN, M.; WOLIN, M.J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 72-77, 1979.

CHIZZOLA, R.; HOCHSTEINER, W.; HAJEK, S. GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twigs in the Rusitec system. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 77-82, 2004.

COTTYN, B.G.; BOUCQUE, C.V. Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 16, n. 1, p. 105-107, 1968.

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

CURADO, M.A.; OLIVEIRA, C.B.A.; JESUS, J.G.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v. 67, n. 21, p. 2363-2369, 2006.

CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Fermentation of various glycolytic intermediates and other compounds by rumen micro-organisms, with particular reference to methane production. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 27, n. 1, p. 131-146, 1972.

DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology**. Thrumpton: Nottingham University Press, 2003. 372 p.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DUARTE, M.C.T.; LEME, E.E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A.A.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.

ESTELL, R.E.; FREDRICKSON, E.L.; TELLEZ, M.R.; HAVSTAD, K.M.; SHUPE, W.L.; ANDERSON, D.M.; REMMENG, M.D. Effects of volatile compounds on consumption of alfalfa pellets by sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 228-233, 1998.

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

ESTELL, R.E.; FREDRICKSON, E.L.; ANDERSON, D.M.; REMMENG, M.D. Effects of α -terpinene, terpinolene, α -copaene, and α -terpinene on consumption of alfalfa pellets by sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 8, p. 1967-1971, 2005.

FILÍPEK, J.; DVORAK, R. Determination of the volatile fatty acid content in the rumen liquid: comparison of gas chromatography and capillary isotachopheresis. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 78, n. 4, p. 627-633, 2009.

FÖRSTER-FROMME, K.; CHATTOPADHYAY, A.; JENDROSSEK, D. Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA. **Microbiology**, Washington, v. 154, n. 3, p. 789-796, 2008.

FURLAN, M.R.; MARTINS, R.C.C.; RODRIGUES, E.; SCALCO, N.; NEGRI, G.; LAGO, J.H.G. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (DC.) Staf, Poaceae, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, 2010. No prelo.

GILLIJ, Y.G.; GLEISER, R.M.; ZYGADLO, J.A. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 7, p. 2507-2515, 2008.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington: USDA, ARS, 2007. (Agriculture Handbook, 379).

GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E.; FERNANDES, P.D. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 486-492, 2007.

GRIFFIN, S.G.; WYLLIE, S.G.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 322-332, 1999.

GUIMARÃES, L.G.; CARDOSO, M.G.; ZACARONI, L.M.; LIMA, R.K. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

HABER, L.L. **Caracterização da diversidade genética, via marcador microssatélite, e constituintes do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* MART.** 2008. Tese (Doutorado em Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2008. Disponível em: <http://www.fca.unesp.br/pos_graduacao/Teses/PDFs/Arq0255.pdf>. Acesso em: 17 out. 2010.

HARDER, J.; PROBIAN, C. Microbial degradation of monoterpenes in the absence of molecular oxygen. **Applied and Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 11, p. 3804-3808, 1995.

HEWLETT PACKARD. **The separation of saturated and unsaturated acids and FAMES using HP-FFAP and HP-INNOWax columns.** Application note 228-398. 1998. Disponível em: <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/59663971.pdf>>. Acesso em: 38 jul. 2010.

HÖSCHLE, B.; GNAU, V.; JENDROSSEK, D. Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, Washington, v. 151, n. 11, p. 3649-3656, 2005.

HRISTOV, A.N.; ROPP, J.K.; ZAMAN, S.; MELGAR, A. Effects of essential oils on *in vitro* ruminal fermentation and ammonia release. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, n. 144, v. 1, p. 55-64, 2008.

KOCHERGINSKAYA, S.A.; AMINOV, R.I.; WHITE, B.A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. **Anaerobe**, London, v. 7, n. 1, p. 199-134, 2001.

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.

LONGO, C.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; GODOY, P.B.; CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

LYRA, C.C.G.V.; VIEIRA, R.F.; OLIVEIRA, C.B.A.; SANTOS, S.C.; SERAPHIND, J.C.; FERRI, P.H. Intraspecific variability in the essential oil composition of *Lychnophora ericoides*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 5, p. 842-848, 2008.

MACKIE, R.I.; WHITE, B.A. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 10, p. 2971-2995, 1990.

MAKKAR, H.P.S. Recent advances in *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: FAO. **FAO animal production and health 160: assessing quality and safety of animal feeds**. Rome, 2004. chap. 3, p. 55-88. Disponível em: <<http://ftp.fao.org/docrep/fao/007/y5159e/y5159e00.pdf>>. Acesso em: 22 set. 2010.

MALECKY, M.; BROUDISCOU, L.P. Disappearance of nine monoterpenes exposed *in vitro* to the rumen microflora of dairy goats: effects of inoculum source, redox potential, and vancomycin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 1366-1373, 2009.

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

MARCO, C.A.; INNECCO, R.; MATTOS, S.H.; BORGES, N.S.S.; NAGAO, E.O. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 3, p. 429-432, 2007.

MARÓSTICA JR., M.R.; PASTORE, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the transformation of limonene from orange essential oil, using cassaca waste as medium. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 101, n. 1, p. 345-350, 2007.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, n. 4, p. 321-330, 1999.

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.

MEALE, S.J.; CHAVES, A.V.; SCHEI, I.; McALLISTER, T.A.; IWAASA, A.D.; YANG, W.Z.; BENCHAAAR, C. Including essential oils in ruminal batch cultures, or in diets fed to lactating dairy cows: effects on methane emissions. In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 4., 2010, Banff. **Proceedings...** Banff, 2010. p. 136.

MISRA, G.; PAVLOSTATHIS, S.G. Biodegradation kinetics of monoterpenes in liquid and soil-slurry systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 47, n. 5, p. 572-577, 1997.

MOREIRA, F.V.; BASTOS, J.F.A.; BLANK, A.F.; ALVES, P.B.; SANTOS, M.R.V. Chemical composition and cardiovascular effects induced by the essential oil of *Cymbopogon citratus* DC. Stapf, Poaceae, in rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, 2010. No prelo.

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. **Nutrient requirements of small ruminants:** sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington: National Academic Press, 2007. 292 p.

NEWBOLD, C.L.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. The importance of methanogenesis associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 21, n. 4, p. 230-234, 1995.

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

OHENE-ADJEI, S.; CHAVES, A.V.; McALLISTER, T.A.; BENCHAAAR, C.; TEATHER, R.M.; FOSTER, R.J. Evidence of increased diversity of methanogenic *archaea* with plant extract supplementation. **Microbial Ecology**, New York, v. 56, n. 2, p. 234-242, 2008.

OJEU. 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.

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 14-23, 2006.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, Amsterdam, v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.

POCÁ, A.M.P.C. **Biomassa, óleo essencial, perfil fitoquímico e nutrientes da carqueja sob influência de fontes e dose de nitrogênio**. 2005. 59 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PRESTON, T.R. **Tropical animal feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995. 305 p. (Animal Production and Health Paper, 126). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/v9327e/v9327e00.HTM>>. Acesso em: 25 jul. 2010.

REHDER, V.L.G.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M.V.N. Essential oils composition from leaves, inflorescences and seeds of *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker and *Mikania glomerata* Sprengel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. esp., p.116-118, 2006.

RETTA, D.; GATTUSO, M.; GATTUSO, S.; LIRA, P.L.; VAN BARENA, C.; BANDONIA, A. Volatile constituents of five *Baccharis* species from northeastern Argentina. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 7, p. 1379-1384, 2009.

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

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

RUSSELL, 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.

_____. Effects of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

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

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.

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, A.C.A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, L.A.; BUENO, M.; CRIPPA, L.B.; SARTORI, V.C.; DELLACASSA, E.; MOYNA, P. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS systems for Windows PC**: versão 9.1.3. Cary, 2004.

SELJE-ASSMANN, N.; HOFFMANN, E.M.; BECKER, K. A batch incubation assay to screen plant samples and extracts for their ability to inhibit rumen protein degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1/4, p. 302-318, 2008.

SILVA, F.G.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; NASCIMENTO, E.A.; NELSON, D.L.; SALES, J.F.; MOL, D.J.S. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 52-57, 2006.

SIMÕES-PIRES, C.A.; DEBENEDETTI, S.; SPEGAZZINI, E.; MENTZ, L.A.; MATZENBACHER, N.I.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. *Caulopterae* (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. **Plant Systematics and Evolution**, Vienna, v. 253, n. 1/4, p. 23-32, 2005.

SMITH-PALMER, A.J.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, 1998.

SOLIVA, C.R.; ZELEKE, A.B.; CLÉMENT, C.; HESS, H.D.; FIEVEZ, V.; KREUZER, M. *In vitro* screening of various tropical foliages, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, n. 1/3, p. 53-71, 2008.

TASKINEN, J.; MATHELA, D.K.; MATHELA, C.S. Composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 262, p. 364-366, 1983.

TATSUOKA, N.; HARA, K.; MIKUNI, K.; HARA, K.; HASHIMOTO, H.; ITABASHI, H. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. **Animal Science Journal**, Taikoku, v. 79, n. 1, p. 68-75, 2008.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; McALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 3-4, p. 185-197, 1994.

TISSERAND, R. Essential oil – safety I. **The international Journal of Aromaterapy**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.

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

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

VARGAS, R.M.F.; CASSEL, E.; GOMES, G.M.F.; LONGHI, L.G.S.; ATTI-SERAFINI, L.; ATTI-SANTOS, A.C. Supercritical extraction of carqueja essential oil: experiments and modeling. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 375-382, 2006.

VERNIN, G.; PARKANYI, C. GC/MS analyses of the volatile constituents of *Schinus terebinthifolius* from Reunion Island. In: AMERICAN CHEMICAL SOCIETY NATIONAL MEETING, 225., 2003, Washington. **Abstract of papers...** Washington: ACS, 2003.

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

WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 43, n. 10, p. 1452-1459, 1960.

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.

ZORN, H.; NEUSER, F.; BERGER, R.G. Degradation of α -pinene oxide and [$^2\text{H}_7$]-2,5,6-trimethyl-hept-(2*E*)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p. 255-263, 2004.