UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GABRIELA BENETEL

**Uso de óleos essenciais como estratégia moduladora da fermentação ruminal para
mitigação das emissões de metano por bovinos Nelore**

Pirassununga
2018

GABRIELA BENETEL

**Uso de óleos essenciais como estratégia moduladora da fermentação ruminal para
mitigação das emissões de metano por bovinos Nelore**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção ao título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno.

Pirassununga
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB465u Benetel, Gabriela
    Uso de óleos essenciais como estratégia
moduladora da fermentação ruminal para mitigação das
emissões de metano por bovinos Nelore / Gabriela
Benetel ; orientador Ives Cláudio da Silva Bueno. --
Pirassununga, 2018.
    90 f.

    Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia
de Alimentos, Universidade de São Paulo.

    1. Gases do efeito estufa. 2. In vivo. 3.
Metanogênese. 4. Orégano. 5. Tomilho. I. da Silva
Bueno, Ives Cláudio, orient. II. Título.

GABRIELA BENETEL

**Uso de óleos essenciais como estratégia moduladora da fermentação ruminal para
mitigação das emissões de metano por bovinos Nelore**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção ao título de Doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva Bueno – Presidente da Banca e Orientador (FZEA/USP)

Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla – Membro (Cena/USP)

Prof. Dr. Ciniro Costa – Membro (FMVZ/UNESP - Botucatu)

Prof. Dr. Marcus Antonio Zanetti – Membro (FZEA/USP)

Prof^a. Dr^a. Sarita Bonagurio Gallo – Membro (FZEA/USP)

DEDICO

*À minha família, especialmente para a minha mãe
por todo amor, compreensão, sacrifícios e incentivos.*

AGRADECIMENTOS

Deixei para escrever os agradecimentos por último achando finalmente que escrever seria fácil. Me enganei! Digerir todas as emoções que me veio à tona e agradecer a todos que me ajudaram em duas folhas, com certeza é a etapa mais difícil, talvez porque a vida não se coloca em análise estatística e não é pelo “valor de P” que descobrimos a significância das pessoas em nosso caminho.

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora da Conceição Aparecida, por iluminar e proteger meu caminho, atender meus pedidos e pela minha vida. Sou uma pessoa abençoada! Mesmo quando não somos fiéis, Eles permanecem fiéis.

À minha mãe Maria Ondina de Mattos Benetel, todos os agradecimentos são poucos. Sem a sua ajuda eu jamais teria chegado até aqui. Só nós sabemos o quanto foi difícil. Obrigada por tudo mãe, serei eternamente grata.

Ao meu pai Vanderlei Benetel, por todo o apoio, esforços e sacrifícios.

Ao meu irmão Vanderlei Jr (Jú), por sempre me proteger, entender e ser o meu amigo. Conte sempre comigo pro que der e vier!

Ao meu querido avô Luiz de Mattos, por todas as orações, por sempre demonstrar confiança em mim, por ensinar (mesmo sem intenção) sobre amor e princípios, pelas tardes de domingo contando sobre as histórias de sua vida.

À tia Nilza e tia Ana, por sempre torcerem por mim e estarem dispostas em ajudar, por cuidarem tão bem do meu avô e pelos deliciosos almoços comemorativos.

À Ana Cláudia (Cal), por ser minha revisora e parecerista particular, por todo apoio, por ser minha parceira nessa trajetória de pós-graduação onde dividimos conselhos, desabafos, objetivos, sonhos e angústias.

À Erika por todos os conselhos, apoio, ensinamentos de vida, momentos de descontração e por sempre mostrar o lado bom e o que realmente é importante na vida.

Às pessoas que Deus colocou em minha vida e que mesmo longe estão presentes nos meus melhores pensamentos: irmã Bete (Gú), Ana Carolina, Ana Laís, Carol, Aurea e Roberta (Trakinas).

Aos amigos que o doutorado me deu, Katiéli Welter (Kati Katchaça), Flávia (Furacones), Rafaela (Wesley), Richard (Gugu) e Carol. Todos nós sabemos que pesquisa não se faz só. Com a ajuda de vocês tudo se tornou mais fácil. Obrigada também, por todos os momentos de descontração, gargalhadas

À Priscila, Gisele, Paulo (Ganso), Caroline Matos, Gabriela Hespanholo (Lost), Ramón Rueda (Ramonés), Renata Ferigato, Roberta Cracco, Tatiane Ninomya (Panda), Erika Suzuki (Xai), Thaísa de Araújo, Elisa Lima (Blott) por toda ajuda prestada na coleta de dados e/ou análises, momentos de descontração e risadas.

Ao Prof. Cesar Gonçalves de Lima (Cesinha) pela atenção e ajuda nas análises estatísticas.

À Dr^a Rosa Frighetto por toda a cordialidade, análises realizadas e parceria com o Laboratório de Fermentabilidade Ruminal.

Ao Dr. Alexandre Berndt pela transposição de conhecimentos, empréstimo de materiais de coleta e colaboração no desenvolvimento desse projeto.

Agradecimento especial ao meu orientador Prof. Ives Cláudio da Silva Bueno, por ter me dado essa oportunidade, me acolhendo de braços abertos. Por todos os ensinamentos, conversas e conselhos. Por sempre ser muito paciente, educado e compreensivo.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À FZEA pelos maravilhosos 12 anos vividos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos meus animais que tanto amo e fizeram meus dias mais alegres.

À todos que não foram citados mas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão dessa etapa.

Muito obrigada!

Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.

Ayrton Senna

RESUMO

BENETEL, G. Uso de óleos essenciais como estratégia moduladora da fermentação ruminal para mitigação das emissões de metano por bovinos Nelore. 2018. 92 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2018.

O objetivo do presente estudo foi identificar entre 10 óleos essenciais, os dois com maior capacidade mitigadora das emissões de metano proveniente da fermentação *in vitro* da microbiota ruminal de bovinos da raça Nelore (Etapa I), e o subsequente impacto da adoção destes dois óleos essenciais como estratégia nutricional para mitigação das emissões de metano *in vivo* por bovinos Nelore (Etapa II). Na primeira etapa, pela técnica de produção de gases *in vitro* foram avaliados a produção de gases acumulada, a degradabilidade, o fator de partição, a concentração de nitrogênio amoniacal, a produção de ácidos graxos de cadeia curta e a produção de metano com o uso dos óleos essenciais extraídos das seguintes plantas: anis estrelado (*Illicium verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), cravo botão (*Eugenia caryophyllus*), eucalipto staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*), eucalipto globulus (*Eucalyptus globulus*), gengibre (*Zingiber officinale*), ho wood (*Cinnamomum camphora*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*). Todos os óleos essenciais foram testados em quatro doses; 0, 50, 250 e 500 mg/l de meio de incubação. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro blocos, 10 tratamentos, quatro doses e duas réplicas dentro de cada bloco. Os procedimentos estatísticos foram obtidos com auxílio do programa SAS 9.3. Os resultados foram submetidos a análise de variância e regressão, com graus de liberdade desdobrados em efeitos linear e quadrático. A produção de gases acumulada sofreu efeito linear negativo ($P < 0,05$) com o aumento dos níveis de inclusão dos óleos essenciais de citronela, ho wood, orégano e tomilho. A degradabilidade do substrato, a produção total de ácidos graxos de cadeia curta e a concentração de nitrogênio amoniacal não foram afetadas ($P > 0,05$) por nenhum dos tratamentos. As menores produções líquidas de metano estiveram associadas às menores produções acumuladas de gases, nas quais os óleos essenciais de orégano e de tomilho tiveram maior poder mitigador de metano em doses acima de 250 mg/l. Esses mesmos óleos essenciais (tomilho e orégano) mostraram ser os mais promissores para o uso em dietas de bovinos por apresentarem as maiores eficiências na mitigação da produção de metano sem afetar a degradação do substrato, sugerindo provável efeito inibitório sobre a população de

arqueias metanogênicas. Na etapa II, os óleos essenciais de orégano e de tomilho foram avaliados através de um delineamento experimental em quadrados latinos 3x3 replicados com três períodos de 21 dias cada, no qual seis bovinos da raça Nelore foram alimentados com dieta total composta de 70% silagem de milho e 30% concentrado a base de milho e farelo de soja. Os óleos essenciais foram incluídos na dieta na quantidade de 3 ml por kg de concentrado. Foram mensurados o consumo, a digestibilidade aparente total (da MS, da FDN e da FDA), os parâmetros ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e de ácidos graxos de cadeia curta) e a emissão de metano (através da técnica do gás traçador SF₆). As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SAS 9.3, utilizando o procedimento MIXED. O efeito de tratamento foi separado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A inclusão dos óleos essenciais de orégano ou de tomilho na dosagem avaliada *in vivo*, não foi suficiente para promover mudanças significativas ($P>0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados.

Palavras-Chave: Gases do efeito estufa. *In vivo*. Metanogênese. Orégano. Tomilho.

ABSTRACT

BENETEL, G. Use of essential oils as a strategy to modulate the ruminal fermentation to mitigate methane emissions by Nellore cattle. 2018. 92 f. Thesis (PhD in Animal Science) - School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2018.

The objective of this study was to identify two out of 10 essential oils with the greatest capacity to mitigate methane emissions through an *in vitro* fermentation assay using ruminal microorganisms of Nellore cattle (Step I), and the subsequent impact of the use of these two essential oils as a nutritional strategy to mitigate methane emissions *in vivo* trial with Nellore cattle (Step II). In the step 1, it was evaluated through *in vitro* gas production technique the accumulated gas production, degradability, partitioning factor, ammoniacal nitrogen concentration, short chain fatty acid production and methane production, with the use of essential oils extracted from the following plants: anise (*Illicium verum*), citronella (*Cymbopogon winterianus*), clove (*Eugenia caryophyllus*), eucalyptus staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*), eucalyptus globulus (*Eucalyptus globulus*), ginger (*Zingiber officinale*) melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), oregano (*Origanum vulgare*) and white thyme (*Thymus vulgaris*). All essential oils were tested in four doses; 0, 50, 250 and 500 mg / l of incubation solution. The experimental design was in randomized blocks, with four blocks, 10 treatments, four doses and two replicates within each block. The statistical procedures were done with the help of the SAS 9.3 program. The results were analyzed by analysis of variance and regression, with degrees of freedom unfolded in linear and quadratic. Accumulated gas production had a linear negative effect ($P < 0.05$) with increasing the inclusion level of the essential oils of citronella, ho wood, oregano and thyme. Substrate degradability, total short chain fatty acid production and ammoniacal nitrogen concentration were not affected ($P > 0.05$) by treatments. The lower liquid methane yields were associated with lower accumulated gas production, in which oregano and thyme essential oils were the more potent at doses greater than 250 mg / l. These essential oils (thyme and oregano) were the most promising for use in cattle diets because they were the most effective for methane mitigation without affecting substrate degradation, suggesting a probable inhibitory effect on the methanogenic arqueas. In step II, the essential oils of oregano and thyme were evaluated through an experimental design in replicate 3x3 Latin squares with three periods of 21 days each, in which six Nellore cattle were distributed in the control, oregano oil and thyme oil treatments, were fed a total diet

composed of 70% corn silage and 30% of concentrate based on ground corn and soybean meal. The essential oils were included in the diet 3 ml per kg of concentrate. Intake, total apparent digestibility (DM, NDF and ADF), ruminal parameters (pH, concentration of ammoniacal nitrogen and short chain fatty acids) and methane emission (through SF₆ tracer gas) were measured. The inclusion of the essential oils of oregano or thyme in the dosage evaluated was not sufficient to promote significant changes ($P > 0.05$) in any of the outcomes evaluated.

Keywords: Greenhouse gases. *In vivo*. Methanogenesis. Oregano. Thyme.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica do feno de capim <i>coast-cross</i> utilizados no bioensaio <i>in vitro</i> da metanogênese, expresso em matéria seca (%MS)	32
Tabela 2 - Composição percentual dos ingredientes da dieta, expresso em matéria seca (%MS)	38
Tabela 3 - Composição bromatológica da silagem, do concentrado e da dieta experimental, expresso em matéria seca (%MS)	38
Tabela 4 - Análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado	39
Tabela 5 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de anis estrelado (<i>Illicium verum</i>)	48
Tabela 6 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>)	49
Tabela 7 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de cravo botão (<i>Eugenia caryophyllus</i>)	49
Tabela 8 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de eucalipto globulus (<i>Eucalyptus globulus</i>)	50
Tabela 9 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de eucalipto staigeriana (<i>Eucalyptus staigeriana</i>)	50
Tabela 10 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)	51
Tabela 11 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de ho wood (<i>Cinnamomun camphora</i>)	51
Tabela 12 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	52
Tabela 13 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	52
Tabela 14 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de tomilho branco (<i>Thyme vulgaris</i>)	53
Tabela 15 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de gases acumulada (ml/g MS) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	54
Tabela 16 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) após 24 h de incubação	56
Tabela 17 - Efeitos dos óleos essenciais sobre o fator de partição da matéria seca (FPMS) e da matéria orgânica (FPMO) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	58
Tabela 18 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃ , em mg/dl) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	59
Tabela 19 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a concentração total dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, em mM) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	60
Tabela 20 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácido acético (mM) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	62
Tabela 21 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácido propiônico (mM) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	62
Tabela 22 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácido butírico (mM) após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	63
Tabela 23 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a relação dos ácidos acético e propiônico após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	63
Tabela 24 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de metano após 24 h de incubação <i>in vitro</i>	64

Tabela 25 - Consumo matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET)	66
Tabela 26 – Estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de dieta de bovinos contendo óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET)	67
Tabela 27 - Produção de metano por bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), determinada pela técnica do gás traçador SF ₆	69
Tabela 28 - Parâmetros da fermentação ruminal de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET)	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biossíntese de fenilpropanoides.....	21
Figura 2 - Biossíntese de terpenoides	21
Figura 3 - Local e modo de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	23
Figura 4 - Representação diagramática da técnica <i>in vitro</i> de produção de gases.....	33
Figura 5 - Foto das instalações do Confinamento Experimental	37
Figura 6 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental.....	40
Figura 7 - Bovino equipado com cabresto e canga de adaptação	41
Figura 9 - Aparatos e amostras pré-incubadas no rúmen para determinação da digestibilidade	45
Figura 11 - Valores médios do pH ruminal de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal: antes, 4, 8 e 12 h após a alimentação matinal	71
Figura 12 - Valores médios da concentração de nitrogênio amoniacal de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal: antes, 4, 8 e 12 horas após a alimentação matinal.....	73
Figura 13 - Valores médios dos ácidos graxos de cadeia curta de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal, antes, 4, 8 e 12 horas após a alimentação matinal: a) concentração mM do total de ácidos graxos de cadeia curta; b) porcentagem do ácido acético; c) porcentagem do ácido propiônico; d) concentração do ácido butírico; e) relação acetato: propionato	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC – ácidos graxos de cadeia curta
C₂ – ácido acético; acetato
C₂:C₃ – relação entre os ácidos acético:propiónico; relação entre acetato:propionato
C₂:C₃:C₄ – relação entre os ácidos acético:propiónico:butírico; relação entre acetato:propionato:butirato
C₃ – ácido propiónico; propionato
C₄ – ácido butírico; butirato
C₅ – ácido valérico; valerato
CG/MS – cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
CH₄ – metano
cm – centímetro
cm² – centímetro quadrado
cm³ – centímetro cúbico
Ca – cálcio
CMS – consumo de matéria seca
CNF – carboidratos não fibrosos
Co – cobalto
CO₂ – dióxido de carbono
CON – controle
Cr – cromo
CT – carboidratos totais
Cu – cobre
DIVMO – degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica
DIVMS – degradabilidade *in vitro* da matéria seca
EA – eficiência alimentar
EE – extrato etéreo
ESALQ – Escola Superior Luiz de Queiroz
F – flúor
FDA – fibra em detergente ácido
FDAi – fibra em detergente ácido indigestível
FDN – fibra em detergente neutro
FDNi – fibra em detergente neutro indigestível
FP – fator de partição
FPMO – fator de partição da matéria orgânica
FPMS – fator de partição da matéria seca
FZEA – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
g – grama
GEE – gases do efeito estufa
GPD – ganho de peso diário
h – hora
IC₄ – ácido isobutírico; isobutirato
IC₅ – ácido isovalérico; isovalerato
IK – índice Kovats
kg – quilograma
I – iodo
l – litro
LFR – Laboratório de Fermentabilidade Ruminal

m² – metro quadrado
Mg – magnésio
mg – miligrama
ml – mililitro
mm – milímetro
mM – milimolar
MM – matéria mineral
Mn – manganês
MS – matéria seca
MSD – matéria seca degradada
MO – matéria orgânica
N – nitrogênio
N-NH₃ – nitrogênio amoniacal
N₂O – óxido nitroso
OE – óleos essenciais
OEO – óleo essencial de orégano
OET – óleo essencial de tomilho
P – fósforo
PB – proteína bruta
PGA – produção de gases acumulada
pH – potencial hidrogeniônico
ppm – partes por milhão
ppt – partes por trilhão
PUSP-FC – Prefeitura do Campus USP Fernando Costa
PV – peso vivo
s – segundo
Se – selênio
SF₆ – hexafluoreto de enxofre
Tg – teragrama
TL – taxa de liberação
USP – Universidade de São Paulo
Vit A – vitamina retinol
ZAZ – Departamento de Zootecnia
Zn – zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
2.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	22
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E PESQUISAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	23
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ADITIVOS MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	24
3 HIPÓTESE.....	29
4 OBJETIVOS	30
5 MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 ETAPA I: EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	31
5.1.1 Local experimental.....	31
5.1.2 Tratamentos e substrato	31
5.1.3 Bioensaio <i>in vitro</i> da metanogênese.....	32
5.1.4 Análises.....	34
5.1.6 Delineamento experimental e análises estatísticas	36
5.2 ETAPA II: EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	36
5.2.1 Local experimental.....	36
5.2.2 Animais e instalações	36
5.2.3 Tratamentos	37
5.2.4 Manejo nutricional.....	37
5.2.5 Delineamento experimental.....	39
5.2.6 Período experimental	39
5.2.7 Coleta de fezes.....	40
5.2.8 Análises.....	40

5.2.9 Análise estatística	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1 ETAPA I: EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i>	48
6.1.1 Composição química	48
6.1.2 Bioensaios <i>in vitro</i> da metanogênese	53
6.2 ETAPA II: EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	65
6.2.1 Consumo de matéria seca	65
6.2.2 Digestibilidade aparente total	67
6.2.3 Produção de metano ruminal.....	68
6.2.4 Parâmetros da fermentação ruminal.....	69
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

Com as projeções de crescimento demográfico, a população mundial deverá ultrapassar 9,6 bilhões de pessoas em 2050 contra os atuais 7,3 bilhões, cerca de 25% a mais do número atual (ONU, 2013), coincidindo com o aumento no poder econômico principalmente da China, Índia, Estados Unidos, Indonésia e Brasil (PwC, 2015). Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura), com uma população mais numerosa, mais urbanizada e a médio prazo mais rica, haverá o desafio de satisfazer a demanda global de alimentos, que em 2050 será 60% superior (ONU, 2015).

Armstrong (2009) citou que cerca de 70% do aumento da demanda de alimentos deve vir de uma maior eficiência gerada pela tecnologia contra 20% da maior mobilização de terras para produção e 10% do aumento do número das safras agrícolas. Com isso, a redefinição das tecnologias pré-existentes e a descoberta de novas ferramentas serão fundamentais para melhorar a produtividade no futuro.

O Brasil ocupa posição de destaque na produção pecuária. Possui o maior rebanho comercial de bovinos do mundo com 219 milhões de cabeças, cerca de 13,4% do rebanho mundial. Em 2016 foram produzidas 9,14 milhões de toneladas equivalentes de carcaça, onde cerca de 20% foram destinadas à exportação e 80% ao abastecimento do mercado interno, garantindo um consumo de 35,8 kg de carne bovina por habitante (ABIEC, 2017).

Apesar da reconhecida importância da pecuária na produção de alimentos e geração de renda, atualmente muito se discute sobre o impacto ambiental da atividade, principalmente relativo às mudanças climáticas. A pecuária brasileira, em especial, vem sendo criticada por emitir quantidades significativas de gases de efeito estufa (GEE). Tal crítica tem sido fundamentada nos baixos índices zootécnicos verificados em sistemas de produção animal baseados em pastagens degradadas ou que se encontram abaixo do seu potencial de produção. A ineficiência desse modelo de exploração tem gerado maiores quantidades de GEE por quilo de carne e/ou de leite produzidos (IPCC, 2007).

Dentre os vários GEE, a agricultura e a pecuária contribuem de forma significativa com a emissão de três deles: dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e óxido nitroso (N_2O). Os animais podem contribuir diretamente com o aumento da concentração de CH_4 através de duas vias principais: pela fermentação de dejetos orgânicos e pela fermentação entérica (BRASIL, 2002; CLARK; KLEIN; NEWTON, 2001; USEPA, 2004). O CH_4 contribui com cerca de 15% do aquecimento global, sendo destes, 3,3% oriundos de ruminantes, devido a uma produção de 22% desse gás pelos mesmos, essa produção está diretamente relacionada

com a eficiência da fermentação ruminal e, conseqüentemente, pela perda de energia nos sistemas de produção (PEREIRA, 2013). O Brasil é apontado como o maior emissor de CH₄ (9,6 Tg de CH₄/ano), seguido da Índia (8,6 Tg de CH₄/ano), e dos Estados Unidos (5,1 Tg de CH₄/ano), quando considerada apenas a emissão por bovinos (THORPE, 2009).

Os ruminantes representam uma das poucas fontes produtoras de CH₄ que podem ser manipuladas (RIVERA; BERCHIELLI, 2010). Dentre as principais variáveis que influenciam a produção de CH₄ em ruminantes, pode-se citar os fatores nutricionais (qualidade e tipo de carboidratos na dieta, nível de ingestão de alimento, presença de aditivos ou lipídios), fatores metabólicos (taxa de passagem da digesta) e fatores ambientais (temperatura e manejo dos animais) (McALLISTER et al., 1996; MILLER, 1995).

Os ionóforos, como a monensina sódica, são aditivos alimentares amplamente utilizados para melhorar a saúde ruminal e favorecer a fermentação. De acordo com Tedeschi Fox e Tylutki (2003), os ionóforos podem reduzir a produção de CH₄ em 25% e a ingestão de alimentos em 4% sem afetar o desempenho animal.

Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso cada vez mais criticado pela sociedade consumidora. Apoiada no princípio da precaução, a União Europeia banuiu em 2006 (diretiva 1831/2003/CEE, Comissão Europeia, 2003) os antibióticos como promotores de crescimento animal. A alegação se baseia na possível presença de resíduos no leite e na carne, além da maior probabilidade de aparecimento de resistência bacteriana aos antibióticos usados na medicina humana.

Frente ao duelo entre questões econômicas, ambientais e de saúde pública, há crescente interesse científico de grupos de pesquisadores por alternativas que proporcionem efeitos semelhantes aos ionóforos, que sejam seguras ao consumo humano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade consumidora (RUSSEL, 2003). Como opções e estratégias de manipulação da fermentação ruminal pode-se citar os óleos essenciais (OE), os quais possuem grande potencial de utilização na nutrição animal, muitos com atividade antimicrobiana cientificamente comprovada (CALSAMIGLIA et al., 2007) e status GRAS (“generally recognized as safe”) para o consumo humano.

Porém ao considerar a grande variedade de OE disponíveis, os resultados encontrados na literatura sobre o efeito da administração na alimentação de bovinos ainda são escassos. Diante dessa carência, torna-se necessário pesquisas que forneçam informações confiáveis quanto aos seus efeitos à nível zootécnico e ambiental, auxiliando no desenvolvimento de estratégias nutricionais sustentáveis que minimizem as emissões de CH₄ pelos bovinos e assegurem o desenvolvimento da pecuária nacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas, sem contribuição direta ao seu crescimento e desenvolvimento, os OE, juntamente com taninos e saponinas desempenham papel ecológico como mensageiros químicos entre as plantas e o ambiente. Assim, o termo “essencial” refere-se a “essência”, relacionado à capacidade dessa substância em fornecer sabores e odores específicos a muitas plantas (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Os OE são substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis, extraídas à vapor ou por solventes de diversas regiões morfoanatômicas das plantas, como por exemplo: flores, cascas, colmos, sementes, frutos e folhas (CALSAMIGLIA et al., 2007). Apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes o que os tornam potenciais aditivos naturais para uso na alimentação de animais (CASTILLEJOS; CALSAMIGLIA; FERRET, 2006).

Uma característica marcante que os difere das substâncias lipídicas é a volatilidade e variação de sua composição entre as diferentes partes da mesma planta (DORMAN; DEANS, 2000). A composição química dos OE varia de acordo com o clima, estação do ano, condições geográficas, propriedades genéticas, período de colheita e da técnica de destilação (KNAAK; FIUZA, 2010).

Do ponto de vista químico, os OE são constituídos pela mistura de diversos componentes, cerca de 20 a 60, com alta complexidade e em diferentes concentrações. Sendo caracterizados por apresentarem dois ou três elementos em concentrações mais elevadas (20 a 70% do total), denominados de compostos majoritários (BAKKALI et al., 2008; DELAMARE et al., 2007; RUSSO et al., 1998; SENATORE, 1996).

Os componentes ativos são derivados do metabolismo secundário das plantas, a partir da glicose, e pertencentes a dois grandes grupos químicos de origem biossintética distinta: os fenilpropanoides e os terpenoides, sendo que os primeiros predominam (BAKKALI et al., 2008).

Os fenilpropanoides são compostos aromáticos que possuem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresenta uma dupla ligação, podendo ter um grupo funcional com oxigênio. São gerados a partir do ácido chiquímico, formando as unidades básicas dos ácidos cinâmico e p-cumárico, os quais por uma série de oxidações, ciclizações e reações de desidratação produzem os fenilpropanoides simples (Figura 1) (SIMÕES et al., 2007)

2.2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Diversos estudos indicam que os OE possuem ação contra vários tipos de microrganismos, dentre eles bactérias, fungos e protozoários (BURT, 2004). Apesar de OE possuírem ação antibacteriana cientificamente comprovada, seus mecanismos de ação ainda não foram completamente compreendidos (LAMBERT et al., 2001). Considerando a grande diversidade de componentes químicos presentes nos OE e suas concentrações, é provável que a atividade antibacteriana dos mesmos não seja determinada por um mecanismo específico e pode ocorrer potencialização do efeito sinérgico entre os diversos componentes encontrados (BAKKALI et al., 2008).

Os mecanismos mais comumente aceitos como responsáveis pela ação antibacteriana estão relacionados com a capacidade dos OE de causar danos à parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas, o que altera a permeabilidade da membrana citoplasmática (BENCHAAAR et al., 2008). A alteração na permeabilidade da membrana gera fuga de íons e outros componentes citoplasmáticos, o que reduz o gradiente iônico transmembranar, conduzindo à deterioração dos processos essenciais da célula como: transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e reações dependentes de enzimas (Figura 3) (BURT, 2004). Ultee, Kets e Smid (1999), constataram que o carvacrol gerou perdas de íons de potássio e Lambet et al. (2001), verificaram que OE de orégano causou extravasamento de íons de fosfato.

Segundo Calsamiglia et al. (2007), inicialmente as bactérias têm o poder de contrabalancear esses efeitos dos OE usando bomba iônica, não levando à morte celular. Porém, grandes quantidades de energia são utilizadas para esse processo gerando redução no crescimento bacteriano e consequentemente mudanças nas proporções de bactérias ruminais.

Os compostos fenólicos (como carvacrol, eugenol e timol), são os principais responsáveis pelo efeito antibacteriano dos OE (DORMAN; DEANS, 2000). Segundo Chao, Young e Oberg (2000), os componentes terpenoides (principal composto fenólico dos OE) apresentam propriedades antibacterianas para Gram positivas e Gram negativas. Porém, as bactérias Gram positivas parecem ser mais sensíveis às propriedades antibacterianas do que as Gram negativas, devido a ausência da camada externa rica em lipopolissacarídeos, que funciona como barreira, limitando acesso de compostos hidrofóbicos, tais como os OE (RUSSEL, 2002). Em experimento com os dois grupos bacterianos, Naik et al. (2010) demonstraram a maior sensibilidade das bactérias Gram positivas ao OE de capim-cidreira.

Figura 3 - Local e modo de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana

Fonte: Adaptado de Burt (2004).

Segundo Calsamiglia et al. (2007), os efeitos dos OE sobre bactérias Gram-negativas estabelecem uma limitação, já que as propriedades das membranas celulares diminuem a seletividade e aumentam a dificuldade de manipulação da fermentação ruminal. Porém compostos de baixo peso molecular como o carvacrol e o timol, podem interagir com a água via pontes de hidrogênio e por difusão cruzarem a parede externa e chegarem a dupla camada fosfolipídica da parede interna das bactérias Gram negativas (GRIFFIN et al., 1999). Albado, Saez e Gabriel (2001), avaliaram a atividade antibacteriana do OE de orégano (*Origanum vulgare*), e comprovaram efeito antimicrobiano frente as bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e sobre bactérias Gram negativas, justificando seu uso na preparação e conservação de alimentos.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E PESQUISAS *IN VITRO* E *IN VIVO*

O efeito antimicrobiano dos OE tem conduzido diversas pesquisas que investigam o potencial desses na manipulação da fermentação ruminal, buscando melhorias na utilização dos nutrientes pelos ruminantes. Identificar as doses e compostos capazes de manipular a fermentação ruminal com efeitos positivos é um desafio aos pesquisadores.

Apesar do uso das mesmas substâncias, nem sempre os resultados favoráveis apresentados *in vitro* se repetem *in vivo*. Os OE podem apresentar cheiro e gosto acentuados, o que pode dificultar a aceitação animal, e as doses necessárias *in vivo* podem causar efeito negativo sobre o consumo, ou até mesmo serem impraticáveis (VILLALBA; PROVENZA, 2010).

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* (BENCHAAAR et al., 2008; VILLALBA; PROVENZA, 2010). Geralmente as doses *in vitro* são maiores que a necessidade no animal, já que a concentração de microrganismos *in vitro* é menor do que em concentrações naturais. Segundo Calsamiglia et al. (2007), quanto menor a população de microrganismos, maior a dose necessária para a existência de efeito.

Apesar das dificuldades existentes para a transferência das doses, os estudos *in vitro* apresentam diversas vantagens que justificam sua utilização nas pesquisas sobre a fermentabilidade ruminal, dentre eles destacam-se: o custo reduzido, controle ambiental satisfatório, rápida obtenção de resultados, além de permitir trabalhar com um número maior de tratamentos e pequenas quantidades de amostras (ARAÚJO, 2010).

Vale ressaltar também que os resultados encontrados sobre os OE na alimentação animal e como manipuladores da fermentação ruminal ainda são contrastantes, em parte devido às pesquisas terem sido mais bem exploradas a partir da última década. Diante dessa carência de dados na literatura e o vasto número de OE, é necessário o desenvolvimento de novas pesquisas que forneçam informações confiáveis quanto aos seus efeitos em níveis zootécnico e ambiental. Para tanto, experimentos *in vitro* que analisem os efeitos potenciais dos OE sobre a fermentação microbiana do rúmen são indispensáveis, assim como os *in vivo* e de longo prazo.

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO ADITIVOS MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Os primeiros trabalhos que demonstravam os efeitos dos componentes dos OE sobre a fermentação ruminal foram desenvolvidos nas décadas de 1950 e 1960 e mostraram que o limoneno e pineno foram capazes de diminuir a produção de CH₄ (CRANE; NELSON; BROWN, 1957) e o timol de inibir a desaminação ruminal através do acúmulo de

aminoácidos e redução na concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) (BORCHERS, 1965). Na década de 1970, o início da utilização de ionóforos na alimentação animal desacelerou essa linha de pesquisa, sendo o interesse resgatado juntamente com a proibição do uso de antibióticos promotores de crescimento animal pela União Europeia em 2006 (ARAUJO, 2010).

Mudanças no perfil fermentativo, referentes aos produtos resultantes do processo de degradação e balanço populacional de microrganismos do rúmen, assemelham o modo de ação dos OE aos dos ionóforos (CONEGLIAN, 2009). Fadiño et al. (2008), trabalhando com bovinos de corte, verificaram que o óleo de anis apresentou efeitos sobre a concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) semelhantes à monensina e que os óleos de zimbro e cinamaldeído provocaram aumento numérico na concentração de propionato (C_3) e redução na relação dos ácidos acético e propiônico ($\text{C}_2:\text{C}_3$) (CHAVES et al., 2008).

No entanto, o desafio constante é encontrar entre os diversos OE, as doses e/ou componentes capazes de alterar positivamente a fermentação ruminal sem efeito inibitórios na fermentação total. Vale ressaltar que ionóforos, como a monensina, também podem reduzir a degradação e a concentração total de AGCC ruminal em função da dose utilizada (RUSSEL; STROBEL, 1989; VAN NEVEL; DEMEYER, 1977;).

Newbold et al. (2004) constataram que uma mistura de OE composta por timol, limoneno e guaicol na quantidade de 234 mg/kg de concentrado para pequenos ruminantes não alterou o perfil de AGCC, pH e N-NH_3 ruminal. Já a inclusão de 750 mg/dia de OE compostos de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno em silagem de alfafa aumentou a produção total de AGCC; no entanto, o mesmo efeito não foi observado quando substituiu a silagem de alfafa pela de milho (BENCHAAAR et al., 2007a; BENCHAAAR; MCALLISTER; CHOUINARD, 2008). Diversos outros trabalhos já mostraram que os OE são capazes de modificar a fermentação ruminal (CASTILLEJOS et al., 2005; KLEVENHUSEN et al., 2012; MALECKY; BROUDISCOU; SCHMIDELY, 2009; WANG; ZHOU, 2009).

A ausência dos efeitos sobre as concentrações totais de AGCC também pode ser vista de forma positiva desde que acompanhada por decréscimos na relação $\text{C}_2:\text{C}_3$, na concentração de N-NH_3 e produção de CH_4 . Vakili et al. (2013), ao trabalharem com OE de tomilho e canela na dieta de animais em crescimento, não observaram efeito no CMS, ganho de peso diário (GPD), eficiência alimentar (EA), pH, N-NH_3 e AGCC total. No entanto, obtiveram aumento na proporção molar de C_3 e redução do C_2 , gerando assim queda na relação $\text{C}_2:\text{C}_3$, um importante indicativo de possível incremento na eficiência energética da dieta. Evans e Martin (2000), em experimento *in vitro* também constataram redução da relação $\text{C}_2:\text{C}_3$.

Patra e Yu (2012) testaram doses crescentes de OE de cravo, eucalipto, alho, orégano e hortelã-pimenta sobre as concentrações de AGCC, a qual diminuiu com o uso de OE de cravo e orégano, e não se alterando com OE de alho e hortelã-pimenta. A proporção molar de C_2 não foi afetada com o OE de cravo porém decresceu com os óleos de eucalipto e alho e aumentaram com os OE de orégano e hortelã-pimenta.

Aumentar a produção de propionato reduzindo a relação $C_2:C_3$ torna o rúmen energeticamente mais eficiente contribuindo para a queda na produção de CH_4 . A rota metabólica de produção de propionato além de servir de dreno de H^+ , ainda gera uma menor produção desse íon em comparação a rota do acetato ou do butirato (RUSSELL, 2002; VAN SOEST, 1994). Sendo assim, ao aumentar a produção de propionato há maior competição com as arqueias metanogênicas por substrato, gerando menor produção de CH_4 .

Khiaosa-Ard e Zebeli (2013) fizeram uma meta-análise de 28 publicações com diferentes tratamentos utilizando OE, onde as doses variavam de 0,04 a 0,25 g/kg de MS para bovinos de corte, 0,01 a 0,43 g/kg de MS para bovinos leiteiros e 0,02 a 0,75 g/kg de MS para ovinos e caprinos. Os autores encontraram função linear entre as doses e variáveis de fermentação ruminal, onde a concentração de $N-NH_3$ e produção de CH_4 reduziram, até 12% para bovinos de corte, conforme o aumento da dose. As proporções molares de C_2 e C_4 diminuíram enquanto que as de C_3 aumentaram sem alterações na concentração de AGCC para bovinos de corte.

Pesquisas *in vivo*, que tenham avaliado os efeitos dos OE sobre a produção de CH_4 ainda são carentes na literatura, e os seus resultados são bem variados, sendo alguns promissores. Wang et al. (2009) notaram em experimento com ovinos recebendo 250 mg/dia de uma mistura de OE de orégano, diminuição de 12% na quantidade de CH_4 produzido por 15 dias. Sallan et al. (2009) reduziram em 31% a emissão de CH_4 por ovinos com o uso de OE de eucalipto, sem efeitos negativos sobre a digestibilidade. Klevenhuen et al. (2010) trabalhando também com ovinos obtiveram queda de 11% na emissão de CH_4 fornecendo 2g/kg de MS consumida de di-alil-di-sulfeto. Mohammed et al. (2004), testando óleo encapsulado de raiz-forte na quantidade de 20g/kg de MS, obtiveram queda de 19% de CH_4 em bovinos, sem efeito na digestibilidade ou na população de protozoários ruminais.

No entanto, na literatura também encontram-se trabalhos *in vivo* sem efeito dos OE sobre a metanogênese, como por exemplo o estudo conduzido por Meale et al. (2010) testando OE de alho (5 g/d) e de zimbro (2 g/d) em vacas lactantes. Beauchemin e McGinn (2006) também não notaram diferença significativa sobre a produção de CH_4 por bovinos de corte recebendo 1 g/dia de um produto comercial a base de timol, limoneno e guaiacol.

Busquet et al. (2005), em estudo *in vitro*, observaram 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). O mesmo grupo de pesquisadores verificaram que essas substâncias aumentaram a proporção de propionato e reduziram a de acetato (BUSQUET et al., 2005).

Patra e Saxena (2010) avaliaram *in vitro* o efeito de alguns extratos naturais de plantas (cravo-da-índia, erva-doce, cebola, alho e gengibre) sobre a metanogênese. Os autores verificaram que os extratos obtidos a partir de erva-doce, cravo e alho reduziram a produção de CH₄; o obtido a partir do alho reduziu a relação C₂:C₃ e houve queda no número total de protozoários com a utilização do extrato de cravo-da-índia.

É importante ressaltar que o efeito de reduzir a produção de metano não está associado à diminuição da digestibilidade (PATRA; YU, 2012; SOLIVA et al., 2011). A diminuição na produção de metano pode ser causada pelo decréscimo no fornecimento de hidrogênio como substrato para as arqueias metanogênicas (MOSS et al., 2000; HOOK; WRIGHT; MCBRIDE, 2010). McAllister e Newbold (2008) demonstraram com análise de PCR, que houve redução da quantidade de DNA metanogênico sem mudanças na quantidade de DNA bacteriano total, ao verificar que 20 µg/ml de alicina reduziu a produção de CH₄ sem influenciar o padrão de AGCC e concentração de N-NH₃.

Normalmente, os OE não influenciam no pH ruminal (CASTILLEJOS et al., 2007; NEWBOLD et al., 2004), o que em muitos trabalhos pode ter uma representação positiva na manutenção da saúde ruminal (ZEBELI et al., 2012). No entanto, Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006) concluíram em experimento *in vitro* que altas dosagens de OE inibiam a fermentação ruminal, reduzindo a concentração total de AGCC e aumentando o pH.

Porém, os efeitos dos OE podem ser modulados pelo pH do meio. Dietas ricas em concentrado, mais propensas ao baixo pH ruminal, são passíveis de potencializar os efeitos dos OE (CALSAMIGLIA et al., 2007). Isso ocorre, porque esses óleos precisam estar na forma indissociada para interagir com os lipídios da membrana celular, o que é propiciado pela maior acidez do meio. Segundo Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006), 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.

Cardozo et al. (2005) constataram que o óleo de canela e seu principal componente, o cinamaldeído, foram eficientes em aumentar a relação C₂:C₃ ao ser incubado em meio de cultura em pH 7,0, já em incubação em meio de cultura com pH 5,5, houve redução na

relação C₂:C₃.

Normalmente, alterações na produção de N-NH₃ ruminal são dose-dependentes, onde diminuições significativas são observadas com a utilização de doses maiores do que as mínimas efetivas (KLEVENHUSEN et al., 2012).

Os OE podem apresentar efeitos a curto prazo na fermentação microbiana ruminal. Evans e Martin (2000) concluíram que a adaptação do ecossistema ruminal com a utilização de OE ocorreu após seis dias. Cardozo et al. (2004) observaram que os OE de cinamaldeído, alho, anis e orégano foram capazes de aumentar a produção de propionato e diminuir a de acetato durante os primeiros seis dias do período de adaptação, não havendo diferença após esse período.

Rivaroli (2014) avaliou o desempenho de 27 bovinos mestiços (1/2 Angus vs. 1/2 Nelore) não castrados terminados em confinamento por 130 dias recebendo dieta com 90% de concentrado e a adição de 3,5 e 7,0 g/animal/dia de OE formados por uma mistura de extratos vegetais: orégano, alho, limão, alecrim, tomilho, eucalipto e laranja doce. A inclusão de 3,5 e 7,0 g/animal/dia da mistura não influenciou o desempenho animal, características de carcaça, ingestão de matéria seca, o peso vivo final e o ganho de peso médio diário.

3 HIPÓTESE

A hipótese a ser testada é que os OE são capazes de modular a fermentação ruminal, e quando fornecidos através da alimentação de bovinos reduzem a produção de CH₄ pelos animais.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral deste experimento foi avaliar a capacidade dos OE na mitigação das emissões de CH₄ produzidos pela fermentação ruminal de bovinos Nelore.

Os objetivos específicos para a comprovação da hipótese foram:

- Avaliar dez OE encontrados no mercado brasileiro quanto a capacidade redutora de produção de CH₄ proveniente da fermentação *in vitro* da microbiota ruminal de bovinos de corte (Etapa I);
- Verificar se há efeito de dose na capacidade mitigadora das emissões de CH₄ *in vitro* (Etapa I);
- Avaliar o impacto da adoção de dois OE como estratégia nutricional sobre a produção de CH₄ *in vivo* (Etapa II);
- Avaliar se o uso de OE em dietas de ruminantes afetam o consumo e a digestibilidade de nutrientes (Etapa II).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ETAPA I: EXPERIMENTO *IN VITRO*

5.1.1 Local experimental

O bioensaio *in vitro* da metanogênese foi conduzido nas instalações do Laboratório de Fermentabilidade Ruminal (LFR) do Departamento de Zootecnia (ZAZ) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP), localizado em Pirassununga/SP. Os procedimentos realizados envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA/USP, de acordo com o protocolo de nº 2551071117.

5.1.2 Tratamentos e substrato

Dez OE obtidos de indústria nacional (Ferquímica®, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) foram utilizados como tratamento: anis estrelado (*Illicium verum*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), cravo botão (*Eugenia caryophyllus*), eucalipto staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*), eucalipto globulus (*Eucalyptus globulus*), gengibre (*Zingiber officinale*), ho wood (*Cinnamomum camphora*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*). Foram testadas quatro doses: 0, 50, 250 e 500 mg/l de meio de incubação.

O substrato utilizado neste experimento foi o feno de *coast-cross*, triturado em moinho de facas com peneira de crivo de 1 mm em moinho tipo Willey. Os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB), foram estimados segundo AOAC (1998), e fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo Van Soest (1994). A composição química do substrato encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição bromatológica do feno de capim *coast-cross* utilizados no bioensaio *in vitro* da metanogênese, expresso em matéria seca (%MS)

Composição bromatológica do feno	
Matéria seca (MS)	88,9
Matéria orgânica (MO)	92,7
Matéria mineral (MM)	7,3
Proteína bruta (PB)	16,5
Fibra em detergente neutro (FDN)	74,3
Fibra em detergente ácido (FDA)	42,1

Fonte: Benetel (2018).

5.1.3 Bioensaio *in vitro* da metanogênese

A técnica *in vitro* de produção de gases utilizada neste trabalho é a semiautomática com transdutor de pressão (Pressure Pressdata 800) descrita em Theodorou et al. (1994), Maurício et al. (1999) e adaptada por Bueno et al. (2005).

O meio nutritivo foi composto por soluções de microminerais ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), de macrominerais (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tampão (NH_4CO_3 e NaHCO_3), redutora (cisteína-HCl; NaOH 1M e $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) e indicadora (resazurina), sendo continuamente saturado com CO_2 e mantido a 39°C até sua utilização.

Quatro bovinos machos da raça Nelore providos de cânula permanente de rúmen foram utilizados como doadores de conteúdo ruminal. Os animais foram mantidos em pastagem de capim *coast-cross* com livre acesso à água e sal mineral. O conteúdo ruminal foi coletado manualmente a partir de três pontos diferentes (porção frontal, mediana e caudal) e imediatamente acondicionados em garrafas e caixas térmicas, livres de oxigênio, para manter a temperatura durante o transporte até o laboratório.

No preparo dos inóculos, seguiu-se as recomendações de Bueno et al. (2005). Para isso utilizou-se o mesmo volume das fases líquidas e sólidas de cada conteúdo ruminal (50:50), que foram homogeneizados em um liquidificador por 10s, para a recuperação dos microrganismos celulolíticos que se aderem fortemente à fração sólida. O material resultante foi filtrado em duas camadas de tecido de algodão. As frações filtradas foram saturadas de CO_2 e mantidas a 39°C sob rotação em uma incubadora *in vitro* (modelo TE-150, Tecnal®, Piracicaba, SP, Brasil) até o término da sua utilização (Figura 4).

Figura 4 - Representação diagramática da técnica *in vitro* de produção de gases

Fonte: Benetel (2018).

A inoculação foi realizada através da injeção do inóculo em cada garrafa de incubação usando seringa plástica graduada. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha, homogeneizadas manualmente, e em seguida mantidas em estufa de circulação forçada de ar a 39°C, permitindo desta forma o acúmulo de gases dentro de cada frasco. Este foi considerado o tempo zero e dado início a contagem dos tempos de fermentação.

Foram utilizadas 280 garrafas de vidro com capacidade para 160 ml que previamente ao experimento foram lavadas com água destilada, secas e identificadas. Em cada garrafa foram adicionados 500 mg de substrato, 25 ml de inóculo, 50 ml de meio

nutritivo, restando um *head space* de 85 ml para acúmulo de gases resultantes da fermentação. A pressão dos gases no *head space* foi medida após 4, 8, 12, 16, 20, 24 h de incubação. Após 24 h, as garrafas foram colocadas em bandejas com água e gelo de modo a cessar a atividade microbiana.

O volume total de gases produzidos em cada garrafa foi determinado de acordo com a equação: $V = (6,4278 * P)$; onde V = volume de gases (ml) e P = pressão mensurada (psi). Esta equação é válida para as condições experimentais para bioensaios de metanogênese específicas do Laboratório de Fermentabilidade Ruminal. A produção total de gases após 24 h de fermentação foi determinada somando-se o volume de gases produzido em cada mensuração de pressão das garrafas.

Paralelamente às mensurações de pressão, uma alíquota dos gases produzidos foi coletada para posterior quantificação CH₄. Amostras do líquido contido em cada garrafa também foram coletadas para a determinação de AGCC e N-NH₃. Ao final, foram determinadas a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica (DIVMO).

5.1.4 Análises

5.1.4.1 Caracterização química

A caracterização química dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório Multiusuários de Bioquímica e Análise Instrumental do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP através de cromatógrafo gasoso acoplada à espectrômetro de massas GC/MS QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan), com uma coluna capilar difenil-dimetil-polissiloxano (5% diphenyl e 95% dimethyl polysiloxane) com 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm, modelo Rtx®-5MS (Bellefonte, EUA). Os compostos voláteis foram identificados através da comparação entre os índices Kovats (IK) calculados e observados em biblioteca da literatura Wiley Library (Version 8) e entre os respectivos espectros de massa. Os maiores picos de área total do cromatograma foram identificados.

5.1.4.2 Determinação da produção de metano

Paralelamente às mensurações de pressão, 1,5 ml dos gases produzido foram coletados de cada garrafa com auxílio de seringas descartáveis e armazenados em tubos de ensaio, previamente identificados e submetidos a vácuo. A quantificação de CH₄ foi determinada por cromatografia, utilizando cromatógrafo de gases (GC-2014, Shimadzu,

Japão), equipado com coluna microempacotada (ShinCarbon® Restek, EUA) a 60°C e um injetor split/splitless e detector dual FID a 120°C, conforme o método descrito por Sallam et al. (2010). Utilizando gás hélio como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. O metano produzido durante a incubação foi calculado de acordo com Longo et al. (2006): $\text{CH}_4 \text{ ml} = (\text{gases total, ml} + \text{head space, 85 ml}) \times \text{CH}_4\%$.

5.1.4.3 Ácidos graxos de cadeia curta

As amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão), através de uma coluna capilar (Stabilwax®, Restek, EUA) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, conforme o método descrito por Erwin, Marco e Emery (1961) e adaptado por Getachew, Makkar e Becker (2002). Utilizando gás hélio como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. Para determinação do AGCC, uma alíquota de 2 ml do conteúdo líquido de cada garrafa foi coletado e acondicionado em microtubo plástico de 2,5 ml, fechado, identificado e armazenado em freezer imediatamente após a coleta. Para a realização da análise o material foi descongelado e centrifugado (14500 g por 10 min), sendo retirados 0,8 ml de sobrenadante e adicionado 0,2 ml de ácido fórmico 98-100% P.A. ACS e 0,1 ml do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservise, EUA). O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservise, EUA). O software GCSolution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para os cálculos.

5.1.4.4 Nitrogênio amoniacal

Para determinação do N-NH₃, 2 ml do conteúdo líquido de cada garrafa foi coletado e armazenados em microtubos plástico de 4,0 ml contendo 1 ml de ácido sulfúrico a 1 N, fechado, identificado e armazenado em freezer até o momento da determinação de N-NH₃. As análises foram realizadas por colorimetria segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

5.1.4.5 Degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica

A DIVMS foi obtida pela filtração dos resíduos da fermentação em cadinhos com placa porosa (porosidade 1) forrados com lã de vidro e posteriormente secos em estufa (105°C) para determinação do resíduo. Pela diferença dos resíduos (cinzas) da queima em mufla (550°C) foi estimada a DIVMO. A relação entre a degradabilidade e a produção total de

gases (ml) em 24 h foi utilizada como índice de eficiência de síntese microbiana (FP: fator de partição) (BLUMMEL; MAKKAR; BECKER, 1997).

5.1.6 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com 4 blocos (4 inóculos provenientes de 4 animais doadores), sendo 10 tratamentos (óleos essenciais), 4 doses e duas réplicas dentro de cada bloco.

Os procedimentos estatísticos foram obtidos com auxílio do programa Statistical Analysis System® (SAS 9.3). Os resultados foram submetidos a análise de variância e regressão, com os graus de liberdade desdobrados em efeitos linear e quadrático, de acordo com o parâmetro avaliado.

5.2 ETAPA II: EXPERIMENTO *IN VIVO*

5.2.1 Local experimental

O experimento foi conduzido no Departamento de Zootecnia (ZAZ) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), nas instalações do Confinamento Experimental e no Laboratório de Fermentabilidade Ruminal (LFR), localizado em Pirassununga – SP, em parceria com a Embrapa Pecuária Sudoeste (São Carlos – SP) e a Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP). Os procedimentos realizados envolvendo o uso de animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA/USP, de acordo com o protocolo de nº 2551071117.

5.2.2 Animais e instalações

Foram utilizados seis bovinos da raça Nelore, machos, castrados, com peso vivo médio de $591,7 \pm 28,8$ kg e portadores de cânulas ruminais com 10 cm de diâmetro e 7,5 cm de espessura. Os animais foram alocados em baias individuais de aproximadamente 20 m² com cochos de cimento e bebedouros automáticos individuais, teto parcialmente coberto e piso de concreto (Figura 5).

Figura 5 - Foto das instalações do Confinamento Experimental

Fonte: Benetel (2018).

5.2.3 Tratamentos

Seis bovinos foram distribuídos a uma das três dietas experimentais, formuladas de forma a atingirem as exigências nutricionais de bovinos de corte em manutenção (NRC, 1996), sendo os tratamentos:

- 1) **Controle (CON):** dieta sem adição de óleos essenciais;
- 2) **Óleos essencial de orégano (OEO):** dieta com adição de 3 ml de óleo essencial de orégano/kg de concentrado;
- 3) **Óleo essencial de tomilho (OET):** dieta com adição de 3 ml de óleo essencial de tomilho/kg de concentrado.

Os OE de orégano e tomilho são produtos comerciais fornecidos através da empresa Ferquima® – Indústria e Comércio de Óleos Essenciais.

5.2.4 Manejo nutricional

Os alimentos foram fornecidos *ad libitum*, duas vezes ao dia, às 8:00 e 16:00 h, na forma de ração completa com proporção volumoso:concentrado de 70:30. A fonte de volumoso utilizada foi silagem de milho e o concentrado constituiu-se de milho grão moído, farelo de soja, óleo de soja, sal comum e núcleo vitamínico mineral. As proporções dos diversos ingredientes da dieta experimental e a composição bromatológica da mesma estão

descritas nas Tabelas 2 e 3. Na manhã seguinte ao oferecimento as sobras eram retiradas e pesadas.

Tabela 2 - Composição percentual dos ingredientes da dieta, expresso em matéria seca (%MS)

Ingredientes da dieta	(% MS)
Silagem de milho	70,0
Milho grão moído	20,0
Farelo de soja	6,5
Núcleo vitamínico mineral	2,0
Óleo de soja	1,0
Sal comum	0,5

Fonte: Benetel (2018).

O núcleo utilizado foi o Minerthal Flexbeef® com os seguintes níveis de garantia por quilograma: Ca (mínimo) – 250 g, Ca (máximo) – 280 g, Co – 22,5 mg, Cu – 750 mg, Cr – 15 mg, S – 45 g, F (máximo) – 150 mg, P (mínimo) – 15 g, I (mínimo) – 22,5 mg, Mg (mínimo) – 15 g, Mn (mínimo) – 1.005 mg, Se (mínimo) – 7,5 mg, S (mínimo) – 75 g, vit A (mínimo) – 142.500 UI, Zn (mínimo) – 1.995 mg.

Tabela 3 - Composição bromatológica da silagem, do concentrado e da dieta experimental, expresso em matéria seca (%MS)

Composição bromatológica da dieta	Silagem	Concentrado	Dieta (70:30)
Matéria seca (MS)	33,9	88,2	50,2
Matéria orgânica (MO)	96,3	90,5	94,6
Matéria mineral (MM)	3,7	9,5	5,4
Extrato etéreo (EE)	2,0	6,0	3,2
Proteína bruta (PB)	13,2	26,5	17,2
Fibra em detergente neutro (FDN)	49,9	19,7	40,8
Fibra em detergente ácido (FDA)	30,7	5,1	23,0
Carboidratos totais (CT)	81,1	58,0	74,2
Carboidratos não fibrosos (CNF)	31,2	38,3	33,4

Fonte: Benetel (2018).

Os concentrados foram produzidos na Fábrica de Rações da Prefeitura do Campus da USP Fernando Costa (PUSP-FC) no dia anterior ao início do período experimental. Para tanto, os ingredientes núcleo vitamínico mineral, óleo de soja, sal comum e OE foram pesados

manualmente e adicionados diretamente no misturador. A inclusão de OE nos tratamentos foram realizadas em substituição parcial do óleo de soja. Após a mistura os tratamentos foram armazenados em sacarias de *nylon*, lacrados e identificados.

5.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 3 x 3 replicado, ou seja, dois quadrados latinos contemporâneos, sendo que a unidade experimental é o animal dentro de cada período. Logo, o experimento contou com 18 unidades experimentais referentes a 3 animais, 3 períodos e 2 quadrados (Quadro 1). A tabela da análise de variância encontra-se abaixo (Tabela 4).

Quadro 1 - Esquema de distribuição dos tratamentos¹ em delineamento de quadrado latino 3x3 replicado

Quadrado	I			II		
Animal	4715	4556	4681	4579	4802	4610
Período I	OET	CON	OEO	OET	CON	OEO
Período II	OEO	OET	CON	CON	OEO	OET
Período III	CON	OEO	OET	OEO	OET	CON

¹CON = dieta controle; OEO = dieta com óleo essencial de orégano; OET = dieta com óleo essencial de tomilho.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 4 - Análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado

Causas de variação	Graus de liberdade
Tratamentos	2
Período	2
Animal dentro de quadrado	4
Quadrado	1
Resíduo	8
Total de unidades experimentais	17

Fonte: Benetel (2018).

5.2.6 Período experimental

O experimento teve duração de 63 dias (13 de junho a 15 de agosto de 2016). A cada período experimental de 21 dias, 14 dias foram destinados para a adaptação às

respectivas dietas e equipamentos de coleta de dados. Os últimos sete dias de cada período foram destinados a coleta de dados e de amostras.

A partir do 14º ao 21º dia foram coletadas as fezes (para estimativa da digestibilidade aparente total), dados de consumo de matéria seca e produção de CH_4 , sendo este último determinado a cada 24 h através da técnica do gás traçador de SF_6 , considerando cinco dias prévios para adaptação às cangas (8º ao 14º dia) antes do início da coleta. No 21º dia, coletou-se conteúdo ruminal para estudo dos parâmetros fermentativos (pH, AGCC e N-NH_3).

Os animais foram pesados no primeiro e último dia de cada período experimental. O consumo de matéria seca (CMS) foi avaliado nos sete dias experimentais. O esquema das coletas está representado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema dos dias de coleta para cada variável avaliada dentro de cada período experimental

Fonte: Benetel (2018).

5.2.7 Coleta de fezes

Amostras fecais de aproximadamente 300 g foram colhidas diretamente do reto dos animais nos últimos sete dias experimentais de cada período. Todas as amostras foram imediatamente acondicionadas em sacos plásticos, identificadas para cada animal e período experimental e armazenadas em freezer. Após, as amostras foram homogeneizadas em amostras compostas de cada animal em cada período.

5.2.8 Análises

5.2.8.1 Consumo de matéria seca

O CMS foi avaliado nos últimos sete dias experimentais de cada período experimental, pela diferença entre a quantidade de alimento ofertada em um dia e as sobras de

alimento, coletada e pesada na manhã seguinte ao fornecimento, multiplicada pela porcentagem de MS das dietas ofertadas e das sobras. Nos mesmos dias, junto com o CMS, foram realizadas amostragens dos alimentos utilizados nas dietas, para análises dos teores de MS, MM, PB e EE, segundo AOAC (1998), e FDN e FDA, segundo Van Soest (1994).

5.2.8.2 Produção de metano ruminal

A emissão de CH_4 foi mensurada através da técnica do gás traçador interno SF_6 , descrita por Jonhson et al. (1994), adaptada por Primavesi et al. (2002) e aprimorada por Berndt et al. (2014).

Cada um dos animais foi avaliado diariamente durante 24 h por 5 dias consecutivos, em cada período experimental. Os bovinos foram equipados com cabrestos e cangas (Figura 7) para coleta de gases cinco dias antes da amostragem, de forma a permitir que os animais se adaptassem aos aparatos facilitando o manejo no período de amostragem.

Figura 7 - Bovino equipado com cabresto e canga de adaptação

Fonte: Benetel (2018).

A taxa de liberação (TL) do gás a partir dos tubos de permeação de SF_6 foi determinada por método gravimétrico, mantendo os tubos em estufa a 39°C , através de pesagens semanais antes de sua inserção no rúmen. Os tubos preenchidos com SF_6 e com TL conhecidas foram inseridos via cânula em cada um dos animais 15 dias antes da amostragem do primeiro período experimental, de forma a permitir que o fluxo do gás traçador se estabilizasse no rúmen.

Os animais foram equipados com cabrestos para coleta de gás ligados a cangas de PVC (60 mm de classe 20) pré-evacuadas, confeccionadas para permitir 50% de enchimento em 24 h. As coletas tiveram início às 8:00 h, diariamente os animais foram recolhidos de suas baias ao centro de manejo de forma a facilitar a troca dos equipamentos. As pressões das cangas foram mensuradas imediatamente após completadas as 24 h de coleta para avaliação da qualidade da coleta (Figura 8). Se a pressão final fosse maior do que a esperada poderia significar que o cabresto foi bloqueado ou desconectado, enquanto abaixo do esperado que o sistema estava com algum ponto de vazamento, em qualquer situação foi realizada a troca do cabresto e da canga. Realizada a troca dos recipientes de coleta, os animais eram reconduzidos para suas baias de origem.

Figura 8 - Mensuração do metano através da técnica do gás traçador SF₆

Legenda: a) Animal imobilizado no tronco de contenção equipado com canga coletora conectada ao tubo capilar fixados no cabresto; b) Retirada da canga coletora; c) Mensuração da pressão da canga com auxílio de manômetro digital portátil.

Fonte: Benetel (2018).

Foram também coletadas amostras para determinação da concentração de SF₆ e CH₄ no ambiente. As pressões, datas e horários da retirada dos recipientes em ambos os casos eram anotados para controle. No momento da análise por cromatografia, as cangas foram pressurizadas com N₂ até aproximadamente 10% acima da pressão atmosférica. As análises de CH₄ e SF₆ foram realizadas na Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna-SP, através cromatógrafo a gás modelo HP6890 (Agilent, Delaware, EUA), com detectores de ionização de chamas (FID) a 280°C, coluna (0,53 mm x 30 m 15 µm) HP-MolSiv (para SF₆), com dois laços de 0,5 cm³ mantidos a 80°C anexados a duas válvulas de seis vias. A

temperatura da coluna foi mantida a 50°C durante a análise e aquecida a 150°C durante cerca de 15 minutos para fins de limpeza. As curvas de calibração foram estabelecidas utilizando gás padrão certificado pela empresa “White Martins” com as concentrações de CH₄, em ppm (4,85 ± 5%, 9,96 ± 1,65% e 19,1% ± 3,44%), e SF₆, em ppt (34 ± 9,0, 91,0 ± 9,0 e 978,0 ± 98,0), de acordo com Westberg et. al. (1998). As emissões de CH₄ foram calculadas através da proporção de CH₄:SF₆ na canga, com cada um dos gases corrigidos para a concentração do branco, em conjunto com a taxa de permeação pré-determinada das cápsulas de SF₆. Na seguinte equação, onde está subscrito M indica amostra medida do animal, e o subscrito BG indica a concentração do branco:

$$RCH_4 = RSF_6 \times \frac{(CH_4)_M - (CH_4)_{BG}}{(SF_6)_M - (SF_6)_{BG}} \times \left(\frac{MW_{CH_4}}{MW_{SF_6}} \right) \times 1000$$

e, ainda, RCH₄ (g/d) é a taxa de emissão de CH₄ ruminal calculada em g/d; RSF₆ representa a taxa de liberação medida a partir da cápsula de SF₆ (mg/d); MW_{CH₄} é a massa molecular do CH₄ (16), e MWSF₆ é a massa molecular do SF₆ (146). As concentrações de CH₄ são expressas em ppm e as de SF₆ em ppt. O fator 1000 realiza a conversão da unidade para que RCH₄ seja expressa na unidade de g/d.

O potencial de emissão de CH₄ foi expresso em diferentes unidades, como: gramas de metano por dia = CH₄ (g/dia); quilogramas de metano por ano = CH₄ (kg/ano); gramas de metano por quilograma de matéria seca consumida = CH₄ (g/kg CMS); gramas por quilos de peso vivo = CH₄ (g/kg PV); gramas por quilos de peso metabólico = CH₄ (g/kg PV^{0,75}), e a porcentagem de energia bruta perdida na forma de CH₄ (YM%) = relação percentual entre a energia perdida na forma de metano e a energia bruta ingerida.

5.2.8.3 Parâmetros da fermentação ruminal

No 21º dia de cada período, amostras de conteúdo ruminal foram coletadas dos animais nos tempos antes (0), 4, 8 e 12 horas após a alimentação matinal. O conteúdo ruminal foi coletado manualmente a partir de 3 pontos diferentes (porção frontal, mediana e caudal), via cânula ruminal e então pressionado através de duas camadas de tecido dessorador para extração do líquido ruminal que foi utilizado para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal: pH, AGCC e N-NH₃.

O pH foi determinado logo após a extração a coleta das amostras de líquido ruminal através de um potenciômetro portátil (HANNA Instruments HI8424), calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e pH 7,0.

Para determinação do AGCC, uma alíquota de 4 ml do conteúdo líquido filtrado foi coletado e acondicionado em frasco de vidro, arrolhado, identificado e armazenado em freezer imediatamente após a coleta. As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (GC-2014, Shimadzu, Japão), utilizando coluna capilar (Stabilwax®, Restek, EUA) a 145°C (isotérmica) e um injetor split/splitless e detector dual FID a 250°C, conforme o método descrito por Erwin, Marco e Emery (1961) e adaptado por Getachew, Makkar e Becker (2002). Utilizando gás hélio como gás de arraste, o ar sintético como comburente e o hidrogênio como combustível. Para a realização da análise o material foi descongelado e centrifugado (14500 g por 10 min), sendo retirados 0,8 ml de sobrenadante e adicionado 0,2 ml de ácido fórmico 98-100% P.A ACS e 0,1 ml do padrão interno (ácido 2-etil-butírico 100 mM, Chemservise, EUA). O padrão externo foi preparado com ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico (Chemservise, EUA). O software GCSolution® (Shimadzu, Japão) foi utilizado para os cálculos.

Para determinação das concentrações de N-NH₃, 2 ml do líquido filtrado foi coletado e armazenados em frascos de vidros contendo 1 ml de ácido sulfúrico a 1 N, arrolhado, identificado e armazenado em freezer até o momento da determinação de nitrogênio amoniacal. As análises foram realizadas por colorimetria segundo método descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977).

5.2.8.4 Digestibilidade aparente total

Os coeficientes de digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes foram estimados a partir da concentração dos indicadores internos fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) e fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). Os procedimentos metodológicos de avaliação *in situ* dos teores de componentes indigestíveis das amostras obtidas nos três períodos experimentais foram conduzidos utilizando três bovinos da raça Nelore castrados e canulados no rúmen e 607 ± 10,0 kg de PV ao início da incubação. Esses animais pertenciam a um grupo total de seis animais, que foram submetidos à avaliação nutricional das dietas, conforme descrito anteriormente.

Os bovinos foram alocados em baia coletiva de aproximadamente 100 m² com cocho de cimento, bebedouro automático e piso de terra batida. Foram alimentados duas vezes ao

dia, às 8:00 e 16:00 h, onde recebiam somente silagem de milho à vontade com livre acesso à água e ao sal mineral. Essa etapa teve duração de 33 dias (25 de agosto a 26 de setembro de 2016), onde 21 dias foram destinados para a adaptação à dieta e às instalações e os últimos 12 dias foram para a incubação das amostras.

Para estimativa da digestibilidade aparente total da MS e dos nutrientes (FDN e FDA), foram amostrados uma vez ao dia, durante 5 dias consecutivos, 300 g das sobras, alimentos e fezes. As fezes foram amostradas diretamente do reto dos animais. Todas as amostras foram imediatamente acondicionadas em bandejas de alumínio, identificada para cada animal e período experimental e colocadas em estufa de circulação forçada (55°C por 72 h). Após, as amostras foram homogeneizadas em amostra compostas de cada animal em cada período, trituradas em moinho de facas com peneiras de crivos de 1 mm, acondicionadas em sacos plásticos para posterior análise.

Para obtenção dos teores de FDNi e FDAi nas amostras, utilizaram-se três repetições de cada amostra pré-seca (alimentos, sobras e fezes), as quais foram acondicionadas em sacos de tecido-não-tecido (TNT 100 g/m²), com dimensões de 10x5 cm, segundo a relação de até 20 mg de matéria seca por cm² de superfície (NOCEK, 1988). Os saquinhos foram então acondicionados em redes tipo *Raschel* acompanhados de aparatos que permitissem melhor manejo e incubação das amostras (Figura 9).

Figura 9 - Aparatos e amostras pré-incubadas no rúmen para determinação da digestibilidade

Fonte: Benetel (2018).

Após 288 h os saquinhos foram retirados do rúmen e lavados com água corrente (Figura 10). Em seguida, as amostras foram submetidas às análises de FDN e FDA em equipamento analisador de fibra da Tecnal® (Piracicaba, SP, Brasil), por 1 h cada. Após esse período foram lavados com água quente e posteriormente com acetona e secos em estufa não ventilada (105°C por 4 h), colocados em dessecador e pesados, obtendo-se assim a concentração de FDNi e FDAi. Não foi feito qualquer ensaio para estimar a taxa de recuperação do indicador e esta foi considerada como sendo 100%.

Figura 10 - Aparatos e amostras após a incubação no rúmen para determinação da digestibilidade aparente total

Legenda: a) Retirada das amostras após 288 h de incubação; b) Amostras após a incubação.

Fonte: Benetel (2018).

5.2.9 Análise estatística

Para o experimento *in vivo*, os dados de CMS, emissão de CH₄ e parâmetros ruminais foram analisados pelo programa Statistical Analysis System (Versão 9.3, 2011) utilizando o procedimento MIXED. Os dados foram submetidos à análise de variância, contemplando como causas de variação o efeito de tratamento, como fator fixo; efeito de período, efeito de animal dentro de quadrado e efeito de quadrado, como efeitos aleatórios; e diferentes momentos de coleta, como fator de medidas repetidas no tempo. O efeito de

tratamento foi separado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise por tempo somente foi realizada quando as interações entre efeito de tempo e efeito de tratamento foram significativas.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + l_j + c_k + q_l + t_i + e_{ijkl}$$

onde, Y_{ijkl} é a variável dependente; μ = média geral; l_j = efeito aleatório do período j ($j = 1, 2, 3$); c_k = efeito aleatório do animal k em cada quadrado ($k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$); q_l = efeito aleatório do quadrado q ($q = 1, 2$); t_i = efeito fixo do tratamento i ($i = 1, 2, 3$); e e_{ijkl} = erro aleatório $ijkl$.

O modelo estatístico utilizado para os dados de parâmetros ruminais foi:

$$Y_{ijklt} = \mu + l_j + c_k + q_l + a_i + b_t + (ab)_{ti} + e_{ijkl}$$

onde, Y_{ijklt} é a variável dependente; μ = média geral; l_j = efeito aleatório do período j ($j = 1, 2, 3$); c_k = efeito aleatório do animal k em cada quadrado ($k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$); q_l = efeito aleatório do quadrado q ($q = 1, 2$); a_i = efeito fixo do fator dieta i ($i = 1, 2, 3$); b_t = efeito fixo do fator tempo t ($t = 1, 2, 3, 4$); $(ab)_{ti}$ = efeito da interação entre fator dieta i e tempo t ; e e_{ijkl} = erro aleatório $ijkl$.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ETAPA I: EXPERIMENTO *IN VITRO*

6.1.1 Composição química

Os compostos secundários majoritários dos OE encontrados através de GC/MS são apresentados nas Tabelas de 5 a 14, os cromatogramas estão nos apêndices.

Tabela 5 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de anis estrelado (*Illicium verum*)

Anis estrelado (<i>Illicium verum</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,419	999	0,73
2	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	16,444	1191	2,07
3	Estragol	C ₁₀ H ₁₂ O	20,102	1291	6,89
4	p-anisalaldeído	C ₈ H ₈ O ₂	22,092	1358	3,84
5	(Z)-anetol	C ₁₀ H ₁₂ O	23,415	1280	79,33
6	p-acetonil anisol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	26,297	1483	5,16
7	Foeniculina	C ₁₄ H ₁₈ O	35,219	1726	1,98

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 6 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*)

Citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	13,833	1090	4,71
2	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	16,410	1177	0,80
3	Isopulegol	C ₁₀ H ₁₈ O	18,167	1205	1,44
4	Citronelal	C ₁₀ H ₁₈ O	18,494	1220	34,21
5	Citronelol	C ₁₀ H ₂₀ O	21,115	1314	17,39
6	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	22,072	1357	20,69
7	acetato de citronelina	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	25,291	1421	3,25
8	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	25,517	1433	0,92
9	acetato de geranila	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	26,284	1473	3,18
10	β-elemeno	C ₁₅ H ₂₄	26,748	1513	2,21
11	iso germacreno D	C ₁₅ H ₂₄	29,629	1590	2,54
12	δ-cadineno	C ₁₅ H ₂₄	30,849	1642	2,88
13	α-elemol	C ₁₅ H ₂₆ O	31,609	1676	3,55
14	Gleenol	C ₁₅ H ₂₆ O	32,448	1684	1,42
15	cadin-4-en-10-ol	C ₁₅ H ₂₆ O	34,688	1718	0,81

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 7 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de cravo botão (*Eugenia caryophyllus*)

Cravo botão (<i>Eugenia caryophyllus</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	Isoeugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	25,823	1453	72,70
2	α-copaeno	C ₁₅ H ₂₄	26,302	1493	0,25
3	(E)-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	27,755	1525	8,39
4	α-humuleno	C ₁₅ H ₂₄	28,799	1566	1,13
5	acetato de eugenol	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	30,891	1659	16,41
6	óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	32,735	1693	1,12

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 8 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de eucalipto globulus (*Eucalyptus globulus*)

Eucalipto globulus (<i>Eucalyptus globulus</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,400	990	4,79
2	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	13,787	1085	15,86
3	eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	14,111	1133	78,70
4	n.i.***	—	19,797	1267	0,65

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção; *** n.i. = Não identificado.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 9 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de eucalipto staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*)

Eucalipto staigeriana (<i>Eucalyptus staigeriana</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,405	994	5,23
2	β -pineno	C ₁₀ H ₁₆	11,945	1020	2,72
3	α -felandreno	C ₁₀ H ₁₆	12,934	1058	1,61
4	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	13,689	1071	4,33
5	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	13,918	1109	23,01
6	Eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	13,989	1129	7,40
7	γ -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	14,957	1138	2,06
8	Terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	16,082	1172	6,86
9	Lianalol	C ₁₀ H ₁₈ O	16,423	1181	1,60
10	Citronelol	C ₁₀ H ₁₈ O	18,374	1215	0,64
11	terpinen-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	19,342	1244	1,21
12	α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	19,811	1272	1,17
13	Neral	C ₁₀ H ₁₆ O	21,584	1337	8,30
14	Nerol	C ₁₀ H ₁₈ O	22,012	1351	6,22
15	Geranial	C ₁₀ H ₁₈ O	22,621	1368	11,29
16	formiato de geranil	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	23,622	1389	0,66
17	ácido gerânico	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	24,371	1402	6,48
18	acetato de neril	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	25,671	1443	2,08
19	acetato de geranil	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	26,314	1503	7,13

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 10 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*)

Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,407	995	2,83
2	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	10,952	1017	8,31
3	6-metil-5-hepten-2ona	C ₈ H ₁₄ O	12,227	1026	0,82
4	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	12,414	1032	0,89
5	β -felandreno	C ₁₀ H ₁₆	13,880	1100	7,34
6	Eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	13,951	1119	3,47
7	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	18,943	1228	1,15
8	α -copaeno	C ₁₅ H ₂₄	26,276	1463	0,83
9	β -elemeno	C ₁₅ H ₂₄	26,758	1523	0,89
10	α -curcumeno	C ₁₅ H ₂₄	29,598	1582	11,21
11	α -funebreno	C ₁₅ H ₂₄	30,060	1601	30,28
12	γ -cadineno	C ₁₅ H ₂₄	30,204	1617	3,26
13	E-E- α -farneseno	C ₁₅ H ₂₄	30,301	1626	5,30
14	β -bisaboleno	C ₁₅ H ₂₄	30,406	1634	8,53
15	Sesquisabineno	C ₁₅ H ₂₄	30,896	1667	14,89

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 11 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de ho wood (*Cinnamomum camphora*)

Ho wood (<i>Cinnamomum camphora</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	óxido de linalol (cis)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	15,469	1157	0,70
2	óxido de linalol (trans)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	16,061	1162	1,22
3	Linalool	C ₁₀ H ₁₈ O	16,714	1201	97,79
4	butirato hexa-(3Z)-enil	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	19,668	1263	0,29

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 12 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	α -tujeno	C ₁₀ H ₁₆	10,146	943	1,08
2	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,402	992	3,46
3	mirceno	C ₁₀ H ₁₆	12,409	1029	0,83
4	α -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	13,420	1061	12,09
5	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	13,680	1066	3,54
6	(Z)- β -ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	13,857	1095	2,46
7	eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	13,942	1114	2,41
8	γ -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	15,029	1153	20,32
9	terpinoleno	C ₁₀ H ₁₆	16,079	1167	4,88
10	terpineno-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	19,519	1257	38,77
11	α -terpineol	C ₁₀ H ₁₈ O	19,857	1274	4,82
12	aromadendreno	C ₁₅ H ₂₄	28,344	1555	1,53
13	viridifloreno	C ₁₅ H ₂₄	30,111	1609	2,26
14	δ -cadineno	C ₁₅ H ₂₄	30,861	1651	1,55

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 13 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
1	α -tujeno	C ₁₀ H ₁₆	10,160	950	0,90
2	β -pineno	C ₁₀ H ₁₆	10,414	998	2,79
3	canfeno	C ₁₀ H ₁₆	10,945	1012	0,46
4	α -pineno	C ₁₀ H ₁₆	11,959	1022	0,73
5	mirceno	C ₁₀ H ₁₆	12,424	1037	2,23
6	α -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	13,400	1056	0,26
7	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	13,722	1076	16,05
8	γ -terpineno	C ₁₀ H ₁₆	14,982	1143	6,88
9	linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	16,443	1186	3,09
10	timol	C ₁₀ H ₁₄ O	23,302	1379	4,93
11	carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	32,749	1709	61,68

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 14 - Identificação e quantificação dos compostos secundários presentes no óleo essencial de tomilho branco (*Thyme vulgaris*)

Tomilho branco (<i>Thymus vulgaris</i>)					
Picos	Compostos	Fórmula	TR*	IR**	(%)
2	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	10,944	1012	1,00
3	Mirceno	C ₁₀ H ₁₆	12,425	1038	1,83
4	p-cimeno	C ₁₀ H ₁₄	13,767	1080	25,17
5	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	13,882	1104	0,26
6	Eucaliptol	C ₁₀ H ₁₈ O	13,973	1124	1,76
7	γ-terpineno	C ₁₀ H ₁₆	14,999	1148	10,07
8	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O	16,474	1196	8,19
9	Canfor	C ₁₀ H ₁₆ O	18,183	1210	2,24
10	Isoborneol	C ₁₀ H ₁₈ O	18,634	1225	0,74
11	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	18,957	1228	1,45
12	terpineno-4-ol	C ₁₀ H ₁₈ O	19,363	1250	1,57
13	Timol	C ₁₀ H ₁₄ O	23,438	1382	38,45
14	(E)-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	27,740	1523	2,42
15	óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	32,738	1701	0,67
16	Carvacrol	C ₁₀ H ₁₄ O	32,742	1706	4,19

* TR = Tempo de retenção (minutos); ** IR = Índice de retenção.

Fonte: Benetel (2018).

6.1.2 Bioensaios *in vitro* da metanogênese

Apesar de já existirem pesquisas com óleos essenciais utilizando a técnica *in vitro* de produções de gases, é importante destacar que nem todos os OE e as variáveis utilizadas nesse trabalho foram avaliados na literatura. Segundo Tisserand (1996), os efeitos dos OE tendem a ser influenciados por seus componentes majoritários, embora seja verdade que os demais componentes e suas concentrações também possam modificar a ação uns dos outros. As possíveis interações sinérgicas ou antagônicas são de difícil mensuração e interpretação.

Nas Tabelas de 15 a 24 são apresentadas diversas variáveis analisadas no processo de bioensaio *in vitro* da metanogênese: produção de gases acumulada (PGA), degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da orgânica (respectivamente, DIVMS e DIVMO), fator de partição da matéria seca e da orgânica (respectivamente, FPMS e FPMO), produção de líquida de metano (CH₄ líq), produção de metano por unidade de MS degradada (CH₄ mL/g MSD), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), produção total de ácidos graxos de cadeia

curta (AGCC), de ácido acético (C₂), de ácido propiônico (C₃) e de ácido butírico (C₄) e relação entre os ácidos acético e propiônico (C₂:C₃).

6.1.2.1 Produção de gases acumulada

Após 24 h de incubação *in vitro*, somente os OE de citronela, ho wood, orégano e tomilho causaram efeitos significativos ($P < 0,05$) na PGA, inibindo-a linearmente conforme o aumento dos níveis de inclusão (Tabela 15).

Tabela 15 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de gases acumulada (ml/g MS) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis	96,65	101,19	102,05	81,66	95,39	7,95	0,137	0,204
Citronela	96,65	102,41	103,87	73,11	94,01	6,37	0,008 ¹	0,006
Cravo	96,65	88,06	98,55	82,87	91,53	7,20	0,342	0,475
E. globulus	96,65	104,99	110,60	99,63	102,97	7,42	0,890	0,571
E. staigeriana	96,65	101,44	116,40	107,23	105,43	6,21	0,370	0,230
Gengibre	96,65	111,48	134,76	120,39	115,82	10,21	0,266	0,139
Ho-wood	96,65	104,36	111,84	72,86	96,43	6,46	0,026 ²	0,008
Melaleuca	96,65	119,49	129,24	118,27	115,91	9,64	0,549	0,272
Orégano	96,65	114,39	87,00	23,93	80,49	10,32	0,001 ³	0,002
Tomilho	96,65	108,92	104,20	26,55	84,08	8,60	0,009 ⁴	0,001

* PGA = produção de gases acumulada; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equações: ¹y = 110,49 - 0,064x; ²y = 107,56 - 0,057x; ³y = 112,70 - 0,151x; ⁴y = 114,65 - 0,128x.

Fonte: Benetel (2018).

Na dose de 500 mg/l, os OE de citronela e de ho wood diminuíram a PGA em aproximadamente 25%. Oh et al. (1967), trabalhando com citronelal e o citronelol, principais compostos do OE de citronela, também observaram redução na produção de gases *in vitro* em aproximadamente 30%.

Os OE de orégano e de tomilho causaram uma diminuição drástica na PGA de até 75%, evidenciando que essas substâncias possuem elevada atividade antimicrobiana em condições ruminais. Segundo Lambert et al. (2011), o OE de orégano possui moléculas de timol e de carvacrol que são os principais responsáveis pelo seu efeito antimicrobiano. García-García, López-Malo e Palou (2011) evidenciaram que o timol isolado pode não ser tão

efetivo na redução do CH₄ quanto a combinação entre ele e carvacrol. Esses autores, ao testarem o efeito isolado do carvacrol e do timol sobre a *Listeria innocua*, obtiveram melhores resultados para o primeiro composto, enquanto que o efeito binário carvacrol mais timol foi mais efetivo para inativar o crescimento da bactéria, evidenciando o efeito sinérgico entre os componentes.

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. Diferentemente, Oh et al. (1967) observaram que α -pineno (2 ml/l) e β -pineno (1 ml/l) aumentaram a produção de gases *in vitro*, enquanto Δ -3-careno (3 ml/l) esta produção.

Vários fatores podem influenciar a PGA e consequentemente, a produção de CH₄ pelos animais através da fermentação ruminal. No entanto, um fator importante nesse processo é a extensão da degradação do alimento. Segundo Bueno et al. (2005), o sistema de produção de gases *in vitro* é capaz de estimar a degradabilidade do alimento (substrato). Diversos trabalhos sugerem que os processos de produção de gases *in vitro* devem ser complementados com a determinação dos resíduos ao final do processo de incubação já que as medições por si só não são satisfatórias e a determinação do resíduo final é capaz de revelar a quantidade de substrato que foi efetivamente utilizada durante o processo de fermentação *in vitro* (GETACHEW et al., 1998).

6.1.2.2 Degradabilidade *in vitro* da matéria seca e orgânica

No presente trabalho, para expressar a relação com os resíduos ao final do processo de fermentação foram utilizadas a DIVMS e a DIVMO (Tabela 16). Somente o OE de tomilho foi capaz de reduzir linearmente a DIVMS. Castilejos et al. (2006) e Fraser et al. (2007), ao trabalharem com 500 ppm de timol (principal composto do OE de tomilho) e cinamaldeído, também observaram redução no desaparecimento de MS com essas substâncias. Trabalhos utilizando OE mostraram significativa redução na degradabilidade do alimento (COBELLIS et al., 2016; PAWAR et al., 2012), o que seria uma desvantagem no uso desse aditivo.

A busca de OE que reduzam o volume de CH₄ produzido sem afetar a degradabilidade do alimento é importante, pois, de acordo com Salman et al. (2010), a cinética de degradação é, dentre vários fatores nutricionais, considerada um fator que interfere no desempenho animal. Alimentos com baixa degradabilidade podem dificultar a extração de substratos pelos microrganismos ruminais e, consequentemente, resultar em limitação de nutrientes (VAN SOEST, 1990).

Tabela 16 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO) após 24 h de incubação

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
DIVMS (%)								
Anis estrelado	24,67	28,76	21,05	20,08	23,64	4,31	0,192	0,411
Citronela	24,67	28,07	21,17	31,86	26,44	5,10	0,441	0,680
Cravo botão	24,67	33,20	25,11	21,17	26,04	5,81	0,276	0,561
E. globulus	24,67	28,47	27,79	26,09	26,76	4,74	0,849	0,958
E. staigeriana	24,67	28,22	24,23	23,19	25,08	5,27	0,551	0,840
Gengibre	24,67	33,92	26,09	24,64	27,33	4,61	0,365	0,674
Ho-wood	24,67	27,48	26,99	27,68	26,71	4,58	0,851	0,792
Melaleuca	24,67	28,44	31,25	23,29	26,91	5,93	0,864	0,882
Orégano	24,67	25,45	25,47	27,07	25,66	5,52	0,438	0,736
Tomilho	24,67	36,28	21,17	18,54	25,16	4,78	0,041 ¹	0,136
DIVMO (%)								
Anis estrelado	25,82	27,60	21,29	19,04	23,44	3,24	0,074	0,202
Citronela	25,82	27,66	21,20	19,28	23,49	3,71	0,130	0,312
Cravo botão	25,82	31,71	25,04	20,73	25,82	4,81	0,203	0,453
E. globulus	25,82	28,35	27,73	24,02	26,48	3,78	0,524	0,746
E. staigeriana	25,82	28,99	24,18	23,41	25,60	4,12	0,411	0,712
Gengibre	25,82	33,01	26,84	25,01	27,67	3,47	0,298	0,588
Ho Wood	25,82	28,33	31,04	24,39	27,40	3,33	0,574	0,487
Melaleuca	25,82	28,83	31,56	24,98	27,80	4,74	0,790	0,830
Orégano	25,82	26,30	26,34	22,71	25,29	4,27	0,162	0,324
Tomilho	25,82	34,58	21,05	20,62	25,52	3,72	0,099	0,229

* DIVMS = degradabilidade *in vitro* da matéria seca; DIVMO = degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equação: $^1y = 32,24 - 0,037x$.

Fonte: Benetel (2018).

Provavelmente o uso de alguns OE no presente experimento, como o OE de citronela, ho wood, orégano e tomilho, apresentaram características hidrofóbicas sobre a parte solúvel do substrato, impedindo o ataque microbiano e seu metabolismo, fatos evidenciados ao analisar a queda PGA e a manutenção na degradabilidade do substrato com o aumento dos níveis de inclusão.

6.1.2.3 Fator de partição da matéria seca e da matéria orgânica

O fator de partição (FP) é uma variável utilizada para relacionar duas variáveis, a degradabilidade e a produção de gases, e é expresso em mg de MS ou de MO degradada *in vitro* por ml de gases produzidos durante o processo de fermentação. O OE de orégano foi o único entre os demais que apresentou efeito linear positivo para as variáveis FPMS e FPMO (Tabela 17). Isso significa que com o aumento das doses desse OE foram necessárias maiores quantidades de MS e MO degradada para gerar 1 ml de gases. Ressalta-se que os gases produzidos representam perda parcial da energia dos alimentos fermentados e, sendo assim, que o aumento do fator de partição significaria mais eficiência no uso da energia. O OE de tomilho apresentou relação quadrática entre dose e FPMO.

É importante destacar, que os fatores de partição, tanto da MS quanto da MO, dos OE de orégano e tomilho do presente trabalho foram excessivamente superiores aos demais óleos quando avaliados na dosagem de 500 mg/l, fato esse que é explicado pela baixa produção de gases e a manutenção da degradabilidade do substrato.

Tabela 17 - Efeitos dos óleos essenciais sobre o fator de partição da matéria seca (FPMS) e da matéria orgânica (FPMO) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
FPMS (mg MSD/ml de gases produzidos)								
Anis estrelado	2,62	3,06	2,13	2,84	2,66	0,71	0,870	0,774
Citronela	2,62	2,89	2,04	3,44	2,75	0,79	0,518	0,497
Cravo botão	2,62	4,07	2,59	2,77	3,01	0,89	0,555	0,830
E. globulus	2,62	2,78	2,26	2,79	2,61	0,60	0,990	0,965
E. staigeriana	2,62	2,93	2,19	2,25	2,50	0,64	0,460	0,718
Gengibre	2,62	3,19	2,05	2,13	2,50	0,54	0,232	0,430
Ho Wood	2,62	2,68	2,43	4,18	2,98	0,72	0,166	0,342
Melaleuca	2,62	2,46	2,45	1,99	2,38	0,50	0,783	0,946
Orégano	2,62	2,28	3,29	13,2	5,35	0,99	0,014 ¹	0,025
Tomilho	2,62	3,42	2,10	7,58	3,93	1,04	0,364	0,278
FPMO (mg MOD/ml de gases produzidos)								
Anis estrelado	2,73	2,91	2,15	2,64	2,61	0,57	0,733	0,730
Citronela	2,73	2,83	2,04	2,99	2,65	0,60	0,721	0,554
Cravo botão	2,73	3,85	2,57	2,73	2,97	0,78	0,547	0,822
E. globulus	2,73	2,76	2,54	2,58	2,65	0,50	0,762	0,941
E. staigeriana	2,73	2,98	2,16	2,25	2,53	0,52	0,347	0,578
Gengibre	2,73	3,08	2,09	2,14	2,51	0,43	0,167	0,325
Ho Wood	2,73	2,76	2,81	3,65	2,99	0,55	0,263	0,491
Melaleuca	2,73	2,51	2,49	2,15	2,47	0,43	0,840	0,953
Orégano	2,73	2,35	3,20	11,21	4,87	0,79	0,010 ²	0,016
Tomilho	2,73	3,26	2,09	7,97	4,01	1,00	0,093	0,038 ³

* FPMS = fator de partição da matéria seca; FPMO = fator de partição da matéria orgânica; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equações: ¹y = 2,21 + 0,008x; ²y = 2,21 + 0,008x; ³y = 3,36 - 0,017x + 0,00005x².

Fonte: Benetel (2018).

6.1.2.4 Concentração de nitrogênio amoniacal

A quantificação da concentração de amônia é um importante indicativo de eficiência de utilização de nitrogênio durante bioensaios *in vitro*, visto que 60 à 80% do nitrogênio incorporado pelos microrganismos ruminais são provenientes da amônia (SATTER; ROFFLER, 1975). Sua concentração pode ser afetada tanto pelo teor de degradabilidade da PB presente no substrato, quanto pela utilização desta por parte dos microrganismos ruminais.

Nesse sentido, a PB funciona como fonte de N-NH₃, e para que os microrganismos ruminais funcionem como dreno deste N-NH₃ é fundamental a disponibilidade de energia em quantidades suficientes. Sendo assim, o teor de N-NH₃ é resultado direto da quantidade gerada e da quantidade utilizada pelos microrganismos ruminais (BORGES, 1999).

As concentrações de N-NH₃, nos diferentes tratamentos e níveis avaliados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃, em mg/dl) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis estrelado	17,08	15,59	16,44	16,67	16,45	0,63	0,439	0,747
Citronela	17,08	16,00	17,92	18,99	17,50	0,72	0,010 ¹	0,041
Cravo botão	17,08	16,19	17,14	17,27	16,92	0,60	0,232	0,476
E. globulus	17,08	16,10	14,72	14,51	15,60	1,46	0,355	0,616
E. staigeriana	17,08	15,67	14,91	17,41	16,27	0,86	0,391	0,192
Gengibre	17,08	17,72	16,37	14,08	16,31	1,17	0,083	0,192
Ho Wood	17,08	15,93	16,32	18,77	17,03	0,64	0,009 ²	0,039
Melaleuca	17,08	14,68	15,55	16,06	15,84	1,48	0,911	0,960
Orégano	17,08	16,80	16,60	16,33	16,70	1,02	0,698	0,903
Tomilho	17,08	15,22	15,57	15,81	15,92	1,10	0,847	0,857

* N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equações: ¹y = 16,10 + 0,006x; ²y = 15,47 + 0,0005x.

Fonte: Benetel (2018).

Os óleos essenciais de citronela e ho wood apresentaram relação linear positiva entre N-NH₃ e níveis de inclusão. Porém, os teores médios de N-NH₃ coletados após 24 h de incubação, demonstraram numericamente pouca variação entre todos os OE e níveis testados, sugerindo uma estabilização do ambiente e do processo fermentativo. As concentrações foram sempre suficientes para suportar o crescimento bacteriano, estando todas bem acima do valor mínimo citado por Satter e Slyter (1974), de 5 ml/dl. Além disso, estiveram acima de 13 mg/dl, valor mínimo necessário para que não haja comprometimento da disponibilidade de N para os microrganismos, ingestão e digestibilidade da fibra (VAN SOEST, 1994).

Benchaar et al. (2007b) não observaram efeito do OE de canela (400 mg/l), de orégano (200 mg/l) e timol (200 mg/l) na concentração de N-NH₃ em relação ao tratamento sem aditivo. Cardozo et al. (2005), ao testarem 0,3 mg/l dos OE de alho, de canela e de orégano,

também não observaram diferença estatística em relação ao controle. Porém as doses de 30 e 300 mg/l reduziram, respectivamente, a concentração de amônia em 32,7 e 55,4% para o OE de alho em 31,6 e 61,9% para o OE de canela e em 26,9 e 64,5% para o OE de orégano. Segundo esses autores, aqueles resultados sugerem que os aditivos diminuíram a desaminação ou que os microrganismos utilizaram os peptídeos e os aminoácidos como fonte de nitrogênio, com consequente redução no N-NH_3 .

6.1.2.5 Ácidos graxos de cadeia curta

Como é conhecido, o principal evento associado com a fermentação ruminal é a produção de AGCC. Na maioria das situações alimentares, o ácido acético é predominante e em conjunto com o ácido butírico, reflete dietas ricas em forragens. Segundo Kozloski (2002), as taxas de produção de AGCC variam com o tempo após a ingestão e com o tipo de alimento. Tentar compreender esse processo e suas fontes de variações pode ajudar a explicar as variações observadas nas produções de gases e na produção de CH_4 por ruminantes.

As concentrações totais dos ácidos graxos de cadeia curta, ácido acético, propiônico, butírico e a relação entre os ácidos C_2 : C_3 são demonstrados nas Tabelas de 19 a 23.

As concentrações totais de AGCC não sofreram efeito para nenhum dos óleos analisados. Apesar disso, os valores demonstrados na Tabela 19 mostram que todos os OE aumentaram as concentrações totais de AGCC em pelo menos dois níveis utilizados.

Tabela 19 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a concentração total dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC, em mM) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis estrelado	11,52	11,59	20,66	12,44	14,05	4,49	0,767	0,377
Citronela	11,52	9,60	24,66	12,80	14,64	5,60	0,698	0,250
Cravo botão	11,52	14,34	26,95	14,76	16,89	5,61	0,690	0,221
E. globulus	11,52	15,98	13,02	19,35	14,97	4,07	0,357	0,598
E. staigeriana	11,52	13,41	19,38	18,79	15,77	3,43	0,170	0,274
Gengibre	11,52	14,35	15,96	24,60	16,61	4,06	0,055	0,159
Ho Wood	11,52	16,69	18,98	17,32	16,13	3,59	0,494	0,702
Melaleuca	11,52	13,58	16,05	26,22	16,84	3,78	0,297	0,582
Orégano	11,52	11,66	16,00	3,99	10,79	3,91	0,437	0,291
Tomilho	11,52	10,68	16,28	17,57	14,01	7,06	0,229	0,488

* AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Fonte: Benetel (2018).

Mais importante do que analisar o efeito de cada OE sobre cada variável relacionada a fermentabilidade ruminal é analisar as influências e as consequências que cada uma exerce na outra. A ausência dos efeitos sobre as concentrações totais de AGCC também pode ser vista de forma positiva desde que acompanhada por aumento da degradabilidade e decréscimos na relação $C_2:C_3$ e produção de CH_4 .

Um metabólito secundário pode ter efeito benéfico contra os microrganismos produtores de metano, mas também podem reduzir a concentração total de AGCC e/ou a degradabilidade do alimento. Existe uma relação inversa entre produção de C_3 e CH_4 , a rota metabólica de produção de propionato além de servir de dreno de H^+ , ainda gera uma menor produção desse íon em comparação a rota do acetato ou do butirato (VAN SOEST, 1994; RUSSELL, 2002). Ao aumentar a produção de propionato há maior competição com as arqueias metanogênicas por substrato, gerando menor produção de CH_4 .

Com exceção do OE de gengibre que sofreu efeito linear positivo somente para a concentração de C_2 , nenhum outro OE alterou estatisticamente nas concentrações de C_2 , C_3 e C_4 (respectivamente, Tabelas 20, 21 e 22). No entanto, os OE de citronela, *E. globulus*, *E. staigeriana*, gengibre, melaleuca, orégano e tomilho sofreram efeito linear positivo para a relação $C_2:C_3$ (Tabela 23), tornando assim o rúmen energeticamente menos eficiente. A não redução da relação $C_2:C_3$ e a manutenção da degradabilidade do feno de croast-cross indica que a adição dos OE apresentou baixa seletividade sobre as bactérias celulolíticas, as quais são responsáveis pela degradação dos componentes fibrosos do substratos e as principais produtoras de C_2 .

Dietas ricas em concentrado são mais propensas ao baixo pH ruminal, potencializando os efeitos dos OE. Segundo Cardozo et al. (2005), o óleo de canela e seu principal componente, o cinamaldeído, aumentam a relação $C_2:C_3$ em meio de incubação com pH 7,0 e em meio com pH 5,5 causa redução na relação $C_2:C_3$. Calsamiglia et al. (2007) também constaram que o timol foi mais efetivo em pH 5,5 do que 6,5.

Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006) em experimento *in vitro* de 24 h, utilizando substrato com 60% de volumoso, avaliou OE composto de eugenol, guaiacol, limoneno, timol e vanilina nas doses de 5, 50, 500 e 5000 mg/l. Os efeitos observados foram dependentes das doses utilizadas. A dose de 500 mg/l de timol reduziu a concentração total de AGCC (-28,5%), a proporção de propionato (-18,4%) e a concentração de $N-NH_3$ (-31,9%), houve aumento na proporção de acetato (+1,8%) e na relação $C_2:C_3$ (+35,5%).

Tabela 20 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácido acético (mM) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis estrelado	7,54	7,90	14,92	8,58	9,74	3,35	0,734	0,337
Citronela	7,54	6,62	18,61	9,54	10,58	4,29	0,410	0,211
Cravo botão	7,54	10,36	20,21	9,49	11,90	4,13	0,775	0,155
E. globulus	7,54	10,50	9,32	14,09	10,36	2,93	0,240	0,476
E. staigeriana	7,54	9,48	14,72	14,13	11,47	2,55	0,111	0,166
Gengibre	7,54	10,32	11,75	18,07	11,92	3,01	0,043 ¹	0,134
Ho Wood	7,54	11,49	14,08	11,28	11,10	2,60	0,587	0,639
Melaleuca	7,54	9,83	11,93	19,52	12,21	2,88	0,239	0,490
Orégano	7,54	7,98	10,77	2,27	7,14	2,56	0,376	0,222
Tomilho	7,54	7,60	11,98	12,69	9,95	5,18	0,209	0,466

* EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equação: $^1y = 8,19 + 0,019x$.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 21 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácido propiônico (mM) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis estrelado	2,42	2,17	3,34	1,97	2,48	0,69	0,856	0,487
Citronela	2,42	1,71	3,45	1,37	2,24	0,82	0,617	0,325
Cravo botão	2,42	2,46	4,11	2,47	2,87	0,94	0,155	0,445
E. globulus	2,42	3,17	2,09	2,99	2,67	0,70	0,918	0,793
E. staigeriana	2,42	2,36	2,66	2,59	2,51	0,55	0,766	0,939
Gengibre	2,42	2,35	2,50	3,85	2,78	0,66	0,143	0,281
Ho Wood	2,42	3,08	2,88	3,62	3,00	0,65	0,346	0,643
Melaleuca	2,42	2,31	2,35	3,46	2,64	0,57	0,873	0,977
Orégano	2,42	2,20	2,46	0,43	1,88	0,68	0,149	0,220
Tomilho	2,42	1,84	2,24	2,05	2,14	0,92	0,605	0,824

* EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 22 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de ácido butírico (mM) após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis estrelado	1,14	1,14	1,80	1,51	1,40	0,39	0,445	0,513
Citronela	1,14	0,96	2,01	1,45	1,39	0,44	0,473	0,379
Cravo botão	1,14	1,15	1,85	1,91	1,51	0,42	0,177	0,355
E. globulus	1,14	1,37	1,23	1,77	1,38	0,36	0,335	0,572
E. staigeriana	1,14	1,19	1,51	1,63	1,37	0,31	0,265	0,525
Gengibre	1,14	1,28	1,30	2,04	1,44	0,35	0,114	0,248
Ho Wood	1,14	1,57	1,58	2,05	1,59	0,37	0,195	0,419
Melaleuca	1,14	1,11	1,37	2,65	1,57	0,35	0,269	0,554
Orégano	1,14	1,12	2,10	1,23	1,40	0,66	0,501	0,540
Tomilho	1,14	0,93	1,52	2,68	1,57	0,93	0,117	0,235

* EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

Fonte: Benetel (2018).

Tabela 23 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a relação dos ácidos acético e propiônico após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
Anis estrelado	3,09	3,49	4,21	4,40	3,80	0,47	0,377	0,094
Citronela	3,09	3,62	5,23	6,76	4,67	0,51	0,001 ¹	0,001
Cravo botão	3,09	4,08	4,83	3,60	3,90	0,50	0,628	0,079
E. globulus	3,09	3,28	4,60	4,58	3,89	0,46	0,022 ²	0,027
E. staigeriana	3,09	4,10	5,32	5,44	4,49	0,46	0,008 ³	0,006
Gengibre	3,09	4,09	4,82	4,65	4,16	0,42	0,049 ⁴	0,029
Ho Wood	3,09	3,75	4,87	3,27	3,74	0,51	0,805	0,205
Melaleuca	3,09	4,24	4,93	5,43	4,42	0,59	0,047 ⁵	0,080
Orégano	3,09	4,76	4,41	4,79	4,26	0,48	0,052 ⁶	0,112
Tomilho	3,09	3,26	4,86	5,03	4,06	0,59	0,058 ⁷	0,113

* C₂:C₃ = relação entre os ácidos acético e propiônico; EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equações: ¹y = 3,10 + 0,008x; ²y = 3,07 + 0,004x; ³y = 3,50 + 0,005x; ⁴y = 3,52 + 0,003x; ⁵y = 3,51 + 0,004x; ⁶y = 3,15 + 0,004x; ⁷y = 2,89 + 0,005x.

Fonte: Benetel (2018).

6.1.2.6 Produção de metano

Os valores referentes à produção de metano com o uso dos OE, expresso em produção líquido (CH₄ líq) ou por grama de matéria seca degradada (CH₄/g MSD) estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24 - Efeitos dos óleos essenciais sobre a produção de metano após 24 h de incubação *in vitro*

Óleos essenciais	Níveis (mg/l)				Média	EPM*	Valores de P	
	0	50	250	500			L*	Q*
CH ₄ líquido (%)								
Anis estrelado	6,92	8,13	9,01	7,52	7,90	0,64	0,699	0,344
Citronela	6,92	7,96	10,3	7,26	8,11	0,42	0,584	0,001 ¹
Cravo botão	6,92	7,90	9,50	6,40	7,68	0,78	0,332	0,082
E. globulus	6,92	8,55	9,87	9,57	8,73	0,62	0,120	0,141
E. staigeriana	6,92	8,45	10,93	11,43	9,43	0,45	0,001 ²	0,001
Gengibre	6,92	8,16	10,79	10,89	9,19	0,45	0,001 ³	0,001
Ho Wood	6,92	8,05	9,42	5,18	7,39	0,59	0,046 ⁴	0,003
Melaleuca	6,92	9,13	11,30	9,95	9,32	0,50	0,171	0,006 ⁵
Orégano	6,92	9,23	6,63	0,17	5,74	0,93	0,001 ⁶	0,001
Tomilho	6,92	9,05	8,53	0,57	6,27	0,48	0,003 ⁷	<,0001
CH ₄ (ml/g MSD)								
Anis estrelado	67,81	81,04	177,24	102,40	107,12	52,52	0,645	0,440
Citronela	67,81	69,39	125,12	117,62	94,99	35,16	0,350	0,542
Cravo botão	67,81	65,73	113,40	92,28	84,81	25,39	0,471	0,540
E. globulus	67,81	84,53	85,02	101,79	84,79	19,11	0,418	0,722
E. staigeriana	67,81	79,98	129,02	131,32	102,03	31,04	0,196	0,373
Gengibre	67,81	54,12	130,35	109,89	90,54	30,75	0,250	0,350
Ho Wood	67,81	66,03	128,45	72,47	83,69	23,75	0,957	0,995
Melaleuca	67,81	107,53	106,01	82,60	90,99	33,20	0,925	0,855
Orégano	67,81	86,84	131,71	3,92	72,57	39,70	0,426	0,184
Tomilho	67,81	57,19	118,88	35,75	69,91	31,47	0,873	0,388

* EPM = erro padrão da média; L = efeito linear; Q = efeito quadrático.

** Equações: ¹y = 7,63 + 0,021x - 0,00004x²; ²y = 8,32 + 0,007x; ³y = 8,18 + 0,006x; ⁴y = 8,66 - 0,005x; ⁵y = 7,98 + 0,024x - 0,00004x²; ⁶y = 9,31 - 0,016x; ⁷y = 9,53 - 0,013x.

Fonte: Benetel (2018).

No presente trabalho observou-se que variações na quantidade de CH₄ podem ocorrer mesmo quando a degradabilidade da dieta não se altera com a adição dos diferentes OE, sendo que as menores produções de CH₄ estiveram associadas a menores PGA. Os OE que demonstraram comportamento linear negativo para a PGA também demonstraram queda na produção líquida de CH₄, sendo eles: citronela, ho wood, orégano e tomilho. Os OE de tomilho e orégano apresentaram maior potencial mitigador das emissões de CH₄, em doses acima de 250 mg/l, chegando a produzir respectivamente 0,17 e 0,57 ml na maior dose (500 mg/) contra 6,92 ml sem a utilização de nenhum OE.

Em experimento testando os OE de tomilho, orégano e canela, e seus compostos puros timol, carvacrol e cinamaldeído, Macheboeuf et al. (2008) observaram que o OE de canela e seu principal composto, em concentrações menores que 3 mmol/l não afetaram a produção de CH₄, já com 5 mmol/l não houve produção CH₄ devido ao acúmulo de hidrogênio no *headspace* do *vial*. Os OE de orégano, tomilho, timol e carvacrol foram mais tóxicos à microbiota ruminal, devido à menor dose necessária (1, 2, 1,5 e 1,5 mmol/l, respectivamente) para inibir a produção de CH₄.

A variável CH₄, expressa em ml/g MSD, representa a relação entre a produção de CH₄ líq e a DIVMS, ou seja, quanto maior for o valor atribuído a essa variável significa que maior é a participação do CH₄ líq produzido por grama de matéria seca degradada (MSD) durante o processo de incubação *in vitro*. Apesar dos OE apresentarem produções de CH₄ (ml/ g MSD) numericamente bem contrastantes, estatisticamente não foram observadas relações significativas entre a produção de CH₄ e a MSD, fato este que pode ser atribuído ao elevado erro padrão da média (EPM), já que CH₄ expresso em ml/g MSD associa variações relacionadas à medição dos gases, concentração de CH₄ líq e resíduo de MS não degradada.

6.2 ETAPA II: EXPERIMENTO *IN VIVO*

6.2.1 Consumo de matéria seca

Os valores referentes ao CMS, expresso em quilograma por dia (kg/dia), em porcentagem de peso vivo (% PV) ou por unidade de peso metabólico (g/kg de PV^{0,75}) estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Consumo matéria seca, expresso em quilograma por dia, porcentagem do peso vivo ou unidade de peso metabólico de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET)

Variáveis	Tratamentos			Média	EPM**	Valor de P
	CON*	OEO*	OET*			
CMS (kg/dia)*	7,89	7,77	7,76	7,81	0,032	0,9683
CPV (% PV)*	1,29	1,27	1,29	1,28	0,001	0,9719
CPM (g/kg PV ^{0,75})*	63,96	63,75	63,96	63,73	0,9339	0,9848

* CON = Controle; OEO = Óleo essencial de orégano; OET = Óleo essencial de tomilho; CMS = Consumo de matéria seca; CPV = Consumo de matéria seca em relação ao peso vivo; COM = Consumo de matéria seca por unidade de peso metabólico.

** EPM = Erro padrão das médias.

Fonte: Benetel (2018).

O CMS médio em relação ao peso metabólico foi de 63,73 g MS/ kg PV^{0,75}. Preston e Leng (1987) afirmaram que este parâmetro pode variar de 30 a 80 g MS/ kg PV^{0,75}. Considerando o alto peso vivo dos animais (591,7 ± 28,8 kg), o consumo quando expresso em porcentagem do peso vivo (%PV), apresentou-se dentro do esperado (1,27% do peso vivo), já que é frequente observar baixo consumo de MS em função do peso vivo em animais mais pesados. Aroeira (1997) explica que o baixo consumo de animais alimentados com dietas com grande participação de alimentos volumosos é explicado pelo controle físico do rúmen através da sua distensão, o qual é ainda mais notório em forragens tropicais devido à maior porcentagem de parede celular presente. Porém, quando as dietas possuem teores de FDN abaixo dos 50 a 60%, como é o caso desse experimento (40,8%), o consumo é limitado pela demanda energética dos animais e não pelo enchimento ruminal (MERTENS, 1987).

Como destacado por Cardozo et al. (2006) e Benchaar et al. (2008), as características dos OE podem alterar o consumo de alimentos pelos animais devido às características individuais de cada óleo, como por exemplo, sabor e odor. No entanto, no presente trabalho, apesar de os OEO e OET serem claramente detectados através do olfato, a inclusão deles na dieta não alterou significativamente (P>0,05) nenhuma das variáveis relacionadas com o consumo. Fugita (2013) observou resultados semelhantes utilizando animais da mesma raça e diferentes misturas de OE à base de orégano, caju e mamona.

Existem poucas informações do efeito dos OE estudados na alimentação de bovinos, principalmente na dose utilizada e em dietas ricas em volumosos, porém seus principais componentes ativos, timol e carvacrol, já foram avaliados em alguns trabalhos. Meyer et al. (2007), testaram um produto comercial composto por diversos princípios ativos de OE (timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limonene), em comparação com a administração de monensina e

a um controle (sem administração de aditivo), para bovinos recebendo dietas alto grão, e não encontraram nenhuma diferença estatística em relação à ingestão de matéria seca.

Benchaar et al. (2006), ao fornecerem 2 ou 4 g/dia de mistura comercial de OE (timol, eugenol, vanilina e limoneno) para bovinos de corte alimentados à base de silagem, também não constataram influência sobre o CMS. Assim como, Chaves et al. (2008), ao trabalharem com cordeiros em crescimento, não observaram influência do carvacrol ou cinamaldeído.

Com base nessas informações, pode-se afirmar que a dose dos OE utilizada não apresentaram redução no consumo em nenhuma das variáveis analisadas, fato este intencional na tentativa de escapar dos efeitos adversos dos OE, o qual poderia comprometer o desempenho animal.

6.2.2 Digestibilidade aparente total

Segundo Firkins et al. (1998), a digestibilidade da MS e dos nutrientes é, na nutrição e alimentação de ruminantes, a variável mais importante, pois essa é influenciada entre outros fatores por ingredientes e aditivos.

Os valores médios da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes (FDN e FDA), nos diferentes tratamentos avaliados encontram-se na Tabela 26.

Tabela 26 – Estimativa da digestibilidade aparente total da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido de dieta de bovinos contendo óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET)

Variáveis	Tratamentos			Média	EPM**	Valor de P
	CON*	OEO*	OET*			
DMS (%)	67,11	66,51	64,09	65,90	15,3369	0,8388
DFDN (%)	60,23	59,35	58,30	59,29	4,1096	0,9296
DFDA (%)	60,95	57,95	55,53	58,14	3,5500	0,9309

* CON = Controle; OEO = Óleo essencial de orégano; OET = Óleo essencial de tomilho; DMS = Coeficiente da digestibilidade aparente da matéria seca; DFDN= Coeficiente da digestibilidade aparente da fibra em detergente neutro; DFDA= Coeficiente da digestibilidade aparente da fibra em detergente ácido.

** EPM= Erro padrão das médias.

Fonte: Benetel (2018).

Os coeficientes de digestibilidade aparente total da MS, FDN e FDA não sofreram efeito da inclusão dos OE na dieta. Da mesma forma, a digestibilidade dos nutrientes não foi afetada em diversos estudos. Lin et al. (2013) trabalhando com os óleos essenciais de orégano, cinamendeído e limão (1,0 g/d) e outro tratamento com combinação de compostos

ativos de óleos essenciais (eugenol, carvacrol, citral e cinamaldeído) em dosagens de 0,5 e 1,0 g/d, não observaram diferenças na digestibilidade da MS, FDN e FDA. Meyer et al. (2009), também não observaram efeitos na digestibilidade da MS e MO (84,3 e 86,0%) ao testar duas misturas de OE compostos por timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno. Assim como Beanchaar et al. (2007) que, ao avaliarem uma mistura de timol, eugenol, vanilina, guaiacol e limoneno cinamaldeído na dosagem de 7,5 g/dia também não obtiveram alterações sobre a digestibilidade da MS (66,4%), PB (61,3%), FDN (52,0%) e FDA (52,2%).

Diferentemente, Martinez et al. (2006) observaram que a digestibilidade *in vitro* da MS e PB diminuíram significativamente nos dois tratamentos com a adição dos óleos essenciais de tomilho salsero (*Thymus zygis*), rico em timol e de tomilho de inverno (*Thymus hyemalis*), rico em carvacrol, em comparação aos tratamentos controle e com monensina. Tekipe et al. (2013) trabalharam com a adição de um produto comercial à base de OE com os principais compostos eugenol e cinamaldeído na alimentação de vacas em lactação na dosagem de 0,525 g/dia e não observaram efeitos sobre a digestibilidade aparente total da maioria dos nutrientes, exceto para o FDN que aumentou com a utilização do produto. Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006), em experimento *in vitro* testando três dosagens (5, 50 e 500 mg/l) de eugenol ou timol, só observaram efeitos na digestibilidade dos nutrientes quando utilizou-se a dosagem de 50 mg/l de timol, a qual proporcionou um aumento na digestão da MS, FDN e FDA.

Diante do exposto acima, nota-se que quando adotado o uso de OE há elevada variação nos dados da digestibilidade dos nutrientes da dieta em ruminantes, sendo esta influenciada pelo óleo escolhido, doses, modo de fornecimento, método de avaliação, dentre outros, os quais são caracterizados individualmente em cada experimento.

6.2.3 Produção de metano ruminal

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para os valores médios de emissão de metano (Tabela 27) quando expressos em gramas de metano por dia = CH_4 (g/dia); quilogramas de metano por ano = CH_4 (kg/ano); gramas de metano por quilograma de matéria seca consumida = CH_4 (g/kg CMS); gramas por quilos de peso vivo = CH_4 (g/kg PV); gramas por quilos de peso metabólico = CH_4 (g/kg $\text{PV}^{0,75}$), e a porcentagem de energia bruta perdida na forma de = CH_4 (YM%).

Tabela 27 - Produção de metano por bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), determinada pela técnica do gás traçador SF₆

Emissão de CH ₄	Tratamentos			Média	EPM**	Valor de P
	CON*	OEO*	OET*			
g/dia	179,34	177,88	172,96	176,73	67,1323	0,9065
kg/ano	65,46	64,93	63,13	64,51	8,9604	0,9630
g/kg CMS*	23,01	24,12	23,02	23,38	2,4679	0,8890
g/kg PV*	0,29	0,29	0,29	0,29	0,0002	0,9849
g/kg de PV ^{0,75}	1,45	1,45	1,43	1,44	0,0014	0,9697
YM (%)*	9,97	9,88	9,62	9,82	0,2074	0,9066

* CON = Controle; OEO = Óleo essencial de orégano; OET = Óleo essencial de tomilho; CMS = consumo de matéria seca; PV = peso vivo; YM = relação percentual entre a energia perdida na forma de metano e a energia bruta ingerida.

** EPM = erro padrão das médias

Fonte: Benetel (2018).

A ineficácia do uso do OEO ou de OET na dosagem de 3 ml/kg de concentrado e em uma dieta com 70% de volumoso sobre a mitigação das emissões de CH₄ ruminal no presente trabalho, possivelmente foi decorrente da dosagem fornecida, estando abaixo do liminar requerido para causar efeitos sobre a população de arqueias metanogênicas.

Embora os OE avaliados não tenham exercido influência na produção de CH₄, o valor anual médio (64,51 kg/ano) esteve próximo a outros trabalhos que também utilizaram a técnica do gás traçador (SF₆) para mensurarem a emissão de CH₄. Demarchi (2003), trabalhando com bovinos da raça Nelore em pastagem de *Brachiaria brizantha* durante todo o ano, concluiu que bovinos (machos e fêmeas) com peso vivo entre 350 e 450 kg emitiram 57,0 kg de CH₄ por ano e touros com peso mínimo de 500 kg emitiram cerca de 70,0 kg por ano.

Dados originários através da técnica do gás traçador também podem ser utilizados para comparar com outras metodologias que estimam ou quantificam direta ou indiretamente a emissão de CH₄, como por exemplo a metodologia do Tier 2, a qual também estimou a emissão de CH₄ por bovinos em 64 kg por ano (IPCC, 2006).

6.2.4 Parâmetros da fermentação ruminal

Não houve efeito de tratamento sobre nenhuma característica de fermentação ruminal avaliada, o que pode ser explicado pela ausência de efeito no consumo dos nutrientes e

digestibilidade, visto que a quantificação da digestibilidade dos nutrientes é uma das variáveis mais importantes no que diz respeito ao aporte de nutrientes para os animais (FIRKINS et al., 1998).

Os valores médios de pH ruminal, N-NH₃ e a concentração dos AGCC, bem como a sua proporção molar (%), apresentados na Tabela 28, não apresentaram efeitos significativos de tratamento e nem da interação entre tratamento e tempo (P>0,05). Conforme esperado, foram observados efeitos significativos (P<0,05) para os tempos de coleta.

Tabela 28 - Parâmetros da fermentação ruminal de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET)

Variáveis	Tratamentos			Média	EPM**	Valor de P		
	CON*	OEO*	OET*			Trat	Hora	Trat*Hora
pH	6,52	6,55	6,53	6,53	0,0407	0,8989	<0,0001	0,9982
N-NH ₃ (ml/dl)*	5,01	5,66	4,87	5,18	0,3898	0,3589	<0,0001	0,5474
AGCC (mM)*	128,13	124,92	123,67	125,57	2,6516	0,5009	<0,0001	0,5427
Acético (%)	63,61	63,44	62,85	63,30	0,4405	0,4711	0,0027	0,8357
Propiônico (%)	21,23	20,23	21,29	20,92	0,6595	0,4765	0,0045	0,8932
Iso-butírico (%)	1,30	1,29	1,33	1,31	0,0416	0,7848	<0,0001	0,9931
Butírico (%)	10,64	11,78	11,37	11,26	0,5351	0,3595	0,925	0,7928
Iso-valérico (%)	2,31	2,33	2,20	2,28	0,0936	0,6019	0,0002	0,9858
Valérico (%)	0,90	0,93	0,96	0,93	0,0466	0,6189	<0,0001	0,6537
Relação C ₂ :C ₃ *	3,03	3,18	3,00	3,07	0,0683	0,2058	0,006	0,9654

* CON = Controle; OEO = Óleo essencial de orégano; OET = Óleo essencial de tomilho; N-NH₃ = nitrogênio amoniacal; AGCC = Ácidos graxos de cadeia curta; C₂:C₃ = Relação acetato:propionato.

** EPM = erro padrão das médias.

Fonte: Benetel (2018).

6.2.4.1 pH

O pH ruminal é uma das mais importantes variáveis da fermentação ruminal. Os valores encontrados neste estudo estão todos dentro da variação de 6,2 e 7,1, recomendada por Ørskov (1988) para manter a motilidade ruminal e digestão da fibra, uma vez que o pH abaixo do recomendado ocorre inibição do crescimento das bactérias fibrolíticas e consequentemente redução da síntese de proteína microbiana. Na Figura 11, o menor valor de pH ruminal observado foi de 6,25 (12 h após a alimentação dos animais) o que provavelmente não influenciou negativamente a digestibilidade da fibra.

Figura 11 - Valores médios do pH ruminal de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal: antes, 4, 8 e 12 h após a alimentação matinal

Fonte: Benetel (2018).

Ao testarem a adição de aditivos alimentares (flavomicina, óleo essencial de orégano ou saponina) na ração de ovelhas composta com 75% de volumoso, Wang et al. (2009) não observaram efeitos do óleo essencial de orégano na dosagem de 250 mg/dia sobre o consumo, digestibilidade e pH ruminal. Tekipe et al. (2011), ao fornecerem óleo essencial de orégano para vacas em lactação, também não observaram efeitos no pH do rúmen. Giannenas et al. (2011) também não observaram efeito de tratamento sobre o pH ruminal de ovelhas em lactação recebendo doses de timol, eugenol, limoneno, guaiacol e vanilina à 0, 50, 100 e 150 mg/kg de concentrado.

Em experimento *in vitro*, Evan e Martin (2000) concluíram que 400 mg/l de timol aumentou o pH ruminal, porém o mesmo efeito não foi observado ao utilizarem doses menores (50, 100 e 200 mg/l). Da mesma forma, Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006) analisaram a influência de doses crescentes (0, 5, 50, 500 e 5000 mg/l) de eugenol, timol, guaiacol, limoneno e vanilina sobre o pH ruminal, os autores concluíram que as doses mais elevadas desses compostos aumentaram o pH, enquanto que as demais doses não influenciaram sobre a variável.

Targer e Krause (2011), trabalhando com vacas em lactação testaram óleos essenciais à base de cinamaldeído, eugenol e capsaicina, não constataram efeitos para CMS, AGCC, pH, digestibilidade de nutrientes, rendimento e composição do leite. Hristov et al. (2012), ao avaliarem quantidades crescentes de eugenol e cinamaldeído 0, 250, 500 e 750 (mg/animal/dia), não observaram efeitos sobre pH ruminal com média de 6,21.

Vale ressaltar que o efeito dos óleos essenciais pode ser modulado pelo pH do meio. Dietas ricas em concentrado, são mais propensas ao baixo pH ruminal e passíveis de potencializar os efeitos dos óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007). Isso ocorre, pois esses óleos necessitam estar na forma indissociada para interagir com os lipídios da membrana celular, fato que é propiciado pela maior acidez do meio. Segundo Castillejos, Calsamiglia e Ferret (2006), quando constatado aumento do pH *in vitro*, atribuíram este aumento à concomitante redução na concentração total de AGCC, demonstrando inibição da fermentação ruminal por doses exageradas.

No presente estudo, a ausência de efeito no pH ruminal entre os tratamentos pode explicar a ausência de efeito nas concentrações de AGCC. Segundo Russel e Dombrowski (1980), o pH ruminal é altamente correlacionado com as concentrações de AGCC, os quais são os principais produtos finais da fermentação e os mais importantes no metabolismo energético em ruminantes.

6.2.4.2 Nitrogênio amoniacal

Os óleos essenciais foram apresentados em diversos estudos como aditivos capazes de modificar a produção de amônia do líquido ruminal (CHAVES et al., 2008; WANAPAT et al., 2008; FRASER et al., 2007). McIntosh et al. (2003), ao testarem *in vitro* uma mistura de OE (timol, eugenol, vanilina e limoneno), observaram uma redução na produção de N amoniacal. Borchers (1965) constatou que o timol resultou em um acúmulo de aminoácidos e redução da concentração de N-NH₃.

No entanto, as concentrações de N-NH₃ no presente trabalho não foram influenciadas pelos tratamentos ($P>0,05$) (Tabela 28). Esta ausência de efeito pode ser explicada pelo fato da dose utilizadas não ter sido suficiente para atuar sobre a população microbiana do rúmen. Apesar de não apresentar diferença significativa entre os tratamentos, as concentrações de N-NH₃ sofreram influência dos horários de coleta ($P>0,05$) (Figura 12).

A concentração média de N-NH₃ no líquido ruminal dos bovinos do presente trabalho foi de 5,18 mg/dl. Segundo Satter e Slyter (1974), 5 mg/dl corresponde a concentração mínima para suprir as necessidades para o crescimento da população microbiana. Entretanto, de acordo com Van Soest (1994), teores de N-NH₃ inferiores a 13 mg/dl no rúmen podem afetar a disponibilidade de N para os microrganismos, comprometendo a ingestão e digestibilidade da fibra.

Figura 12 - Valores médios da concentração de nitrogênio amoniacal de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal: antes, 4, 8 e 12 horas após a alimentação matinal.

Fonte: Benetel (2018).

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

Ao observar o comportamento do gráfico apresentado na Figura 12, constata-se um decréscimo no potencial de produção de $N-NH_3$ às 4 horas após o fornecimento da alimentação aos animais, possivelmente em função de um aumento da atividade fermentativa, com intensa síntese microbiana. Às 8 horas após a alimentação matinal, o OET apresentou uma discreta diminuição da concentração de $N-NH_3$, ao contrário os tratamentos CON e OEO restabeleceram seu potencial de produção, provavelmente devido a maior degradação do alimento pelos microrganismos ruminais e consequente liberação de $N-NH_3$. Para os tempos de 12 horas após a alimentação, os níveis de $N-NH_3$ apresentaram pouca variação entre os tratamentos, indicando uma estabilização do ambiente ruminal e do processo fermentativo.

Observações da concentração de $N-NH_3$ ruminal em intervalos de tempo menores, são necessárias para melhor esclarecimento da ação dos OET e OEO para esta variável.

6.2.4.3 Ácidos graxos de cadeia curta

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos para a concentração total de AGCC, proporções molar dos ácidos acético, propiônico e butírico e, a relação acético:propiônico (Figura 13).

Figura 13 - Valores médios dos ácidos graxos de cadeia curta de bovinos suplementados com óleos essenciais de orégano (OEO) ou de tomilho (OET), nos diferentes tempos de coleta do líquido ruminal, antes, 4, 8 e 12 horas após a alimentação matinal: a) concentração mM do total de ácidos graxos de cadeia curta; b) porcentagem do ácido acético; c) porcentagem do ácido propiônico; d) concentração do ácido butírico; e) relação acetato: propionato

Fonte: Benetel (2018).

Kiaosa-ard e Zebeli (2013) observaram, em extensa revisão, que para alguns OE, os efeitos são dependentes da dose. Normalmente, elevadas inclusões inibem a fermentação ruminal evidenciada pela queda nas concentrações de AGCC (ARAÚJO, 2010). Evan e Martin (2000) diferentemente do presente trabalho, relataram que o timol afetou o metabolismo de bactérias ruminais. Em doses mais elevadas, reduziu a produção total de AGCC, indicando claramente que o metabolismo microbiano foi inibido. Os autores atribuíram esse efeito à danos na membrana celular e redução na absorção de glicose.

No presente estudo, a dosagem utilizada provavelmente não foi suficiente para atuar sobre a população microbiota do rúmen e, conseqüentemente, nas concentrações de AGCC, assim como as demais variáveis analisadas, dentre elas o consumo e a digestibilidade, as quais são correlacionadas. A produção total de AGCC é um resultado direto da composição da dieta e do nível de ingestão (ASCHENBACH et al., 2011). Segundo Coelho e Leão (1979), os AGCC encontrados no rúmen são provenientes, quase que em sua totalidade, da fermentação dos carboidratos dietéticos. Estes ácidos constituem a maior fonte de energia para ruminantes, considerando que somente uma pequena parte dos carboidratos escapa à degradação, no rúmen, após serem ingeridos pelos animais.

Vale ressaltar que os OE podem apresentar efeitos na fermentação microbiana ruminal de curto prazo, onde a adaptação pode ocorrer ainda no período de adaptação. Cardozo et al. (2004) observaram que durante o período de adaptação, os OE de cinamaldeído, alho, anis e orégano reduziram a proporção molar de C_2 , C_3 e C_4 entre os dias dois e seis de fermentação, não havendo diferença após o dia seis.

Muitos estudos também mostraram redução ou ausência dos efeitos dos OE sobre a concentração total de AGCC. García et al. (2007) testaram o efeito do carvacrol (princípio ativo do OEO) sobre a produção de AGCC comparado com o fornecimento de monensina ou sem o fornecimento de aditivo. Esses autores não observaram diferenças significativas ($P>0,05$) na produção total de AGCC quando administrados monensina ou carvacrol em nível de 250 mg/l. No entanto, níveis acima deste (500 mg/l) causaram um decréscimo na produção dos AGCC.

Benchaar et al. (2006), administrando 7,5 g/dia de uma mistura de timol, eugenol, guaiacol, limoneno e vanilina (Crina Ruminantis®) para vacas em lactação, não obtiveram nenhum efeito sobre as concentrações totais de AGCC. Já Giannenas et al. (2011), ao utilizar o mesmo produto comercial para ovelhas em lactação nas dosagens de 0, 50, 100 e 150 mg/kg de concentrado, observaram tendência em aumentar a concentração de AGCC de 115,2 para 126,2 mM.

Segundo Araújo (2010), a ausência de efeito sobre a concentração total de AGCC pode ser vista de forma positiva, desde que acompanhada por alterações na proporção molar dos AGCC. Isto não pode ser observado no presente estudo, considerando que uma das principais vantagens em utilizar OE na alimentação de ruminantes seria o fato de alguns deles manipular alguns parâmetros, como, diminuir a relação $C_2:C_3$, aumentando C_3 e/ou reduzindo C_2 .

Maiores concentrações de propionato estão associadas a melhoria na eficiência de

utilização de energia, com decréscimos nas produções de CH_4 . Ao se produzir propionato não há produção de H^+ como observado nas rotas que levam à produção de acetato e butirato. As vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H^+ (VAN SOEST, 1994; RUSSELL, 2002).

Vakili et al. (2013), ao fornecer OE de tomilho e de canela na dieta de animais em crescimento, não observaram efeito no CMS, GPD, EA, pH, amônia e AGCC total porém, foi observado aumento na proporção molar de propionato e redução do acetato. Patra e Yu (2012) avaliando doses crescentes de OE, observaram decréscimo na concentração de AGCC com o uso de óleo de orégano, aumento na proporção molar de acetato e decréscimo de propionato.

Ao observar as concentrações de isoácidos (isobutirato e isovalerato), conclui-se que os tratamentos utilizados não foram capazes de atuar na desaminação dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina).

A proporção molar de AGCC, produzidos quando o animal alimenta-se basicamente de forragens, representa uma relação 73:20:7 ($\text{C}_2:\text{C}_3:\text{C}_4$), contra 60:30:10 em mistura de concentrado e forragens e 50:40:10 em alimentação a base apenas de concentrado (BLACK, 1990). Considerando apenas os ácidos C_2 , C_3 e C_4 , a proporção molar do presente experimento foi de 66:22:12, semelhantes aos valores citados pelos autores acima quando forneceram dietas contendo volumoso e concentrado.

7 CONCLUSÕES

Dos ensaios *in vitro* (Etapa I), pode-se concluir que os OE de orégano e de tomilho destacaram-se dos demais OE avaliados e mostraram-se os mais promissores para o uso em dietas de bovinos com o objetivo de reduzir a produção ruminal de CH₄. Esses OE não afetaram a degradação do substrato e propiciaram as menores produções líquidas de metano.

No ensaio *in vivo* (Etapa II), a dosagem utilizada dos óleos essenciais de orégano ou de tomilho (3 ml de OE/ kg de concentrado) não foram suficientes para promover alterações significativas no consumo de matéria seca, na produção de metano, nos parâmetros fermentativos e na digestibilidade de nutrientes de bovinos da raça Nelore alimentados com dieta com 70% de volumoso e 30% de concentrado.

REFERÊNCIAS

- ALBADO, P. E.; SAEZ, F. G.; GABRIEL, A. S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). **Revista Medicina Herediana**, Lima, v. 12, p. 16-19, 2001.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1998.
- ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro**. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- ARMSTRONG, W. D. A demanda mundial por proteína animal suas implicações para a indústria de alimentos para animais. In: MIDWEST SWINE NUTRITION CONFERENCE, 2009, Indianapolis. **Resumos...** Indianapolis, 2009. 1 CD-ROM.
- ASCHENBACH, J. et al. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, Cary, v. 89, p. 1092-1107, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDUSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC. **Perfil da pecuária no Brasil**: relatório anual. São Paulo: ABIEC, 2018. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/Sumario.aspx>>. Acesso: 05 fev. 2018.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, Kidlington, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1489-1496, 2006.
- BENCHAAAR, C.; 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 extract. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, p. 4765-4777, 2008.
- BENCHAAAR, C. et al. 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, 2007a.
- BENCHAAAR, C. et al. 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, 2007b.
- BENCHAAAR, C. et al. 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**, New York, v. 90, n. 2, p. 886-897, 2007c.
- BENCHAAAR, C.; DUYNISVELD, J. L.; CHARMLEY, E. Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth

performance of beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 86, n. 1, p. 91-96, 2006.

BERNDT, A. et al. **Guidelines for use of Sulphur hexafluoride (SF₆) tracer technique to measure enteric methane emissions from ruminants**. Wellington: Ministry for Primary Industries, 2014. v. 1.

BLACK, L. L. Crecimiento y desarrollo de corderos. In: HARESIGN, W. **Producción ovina**. México: A. G. T. Editor, S.A., 1990. p. 3-62.

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, p.24-34, 1997.

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

BORGES, A. L. C. C. Controle da ingestão de alimentos. **Cadernos Técnicos da Escola de Medicina Veterinária da UFMG**, Belo Horizonte, v. 27, p. 67-69, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura Abastecimento. **Emissão de metano proveniente da pecuária**. Brasília: MAA; Embrapa Meio Ambiente, 2002. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/clima/comunic_old/pecuar.htm#Index>. Acesso: 09 fev. 2018.

BUENO, I. C. S. et al. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 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. et al. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, n. 7, p. 2508-2516, 2005.

CALSAMIGLIA, S. et al. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CARDOZO, P. W. et al. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Cary, v. 82, n. 11, p. 3230-3236, 2004.

CARDOZO, P. W. et al. 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**, Cary, v. 83, n. 1, p. 2572-2579. 2005.

CARDOZO, P. W. et al. Effects of alfafa 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**, Cary, v. 84, n. 10, p. 2801-2808, 2006.

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**, New York, v. 89, p. 2649-2658, 2006.

CASTILLEJOS, L. et al. 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, p. 186-201, 2007.

CASTILLEJOS, L. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 29-41, 2005.

CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 12, n. 5, p. 639-649, 2000.

CHAVES, A. V. et al. 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.

CLARK, H.; KLEIN, C.; NEWTON, P. **Potential management practices and technologies to reduce nitrous oxide, methane and carbon dioxide emissions from New Zealand Agriculture**. Ngaherehere, NZ: Ministry of Agriculture and Forestry, 2001. Disponível em: <<http://www.maf.govt.nz/mafnet/rural-nz/sustainable-resource-use/climate/green-houseasmigration/ghg-mitigation.htm>>. Acesso: 25 fev. 2018.

COBELLIS, G. et al. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 215, p. 25-36, 2016.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.

CONEGLIAN, S. M. **Uso de óleos essenciais de mamona e caju em dietas de bovinos**. 2009. 101 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

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**, New York, v. 40, n. 10, p. 1317-1323, 1957.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DEMARCHI, J. J. A. A. et al. Daily methane emission at different seasons of the year by Nelore cattle in Brazil grazing *Brachiaria brizantha* cv. Marandu - preliminary results. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9, 2003, Porto Alegre. **Proceedings...** Porto Alegre: World Conference on Animal Production, 2003. 1 CD-ROM.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, Chichester, v. 88, p. 308-3016, 2000.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 44, p. 1768-1771, 1961.

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

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO.

How to feed the world in 2050? Disponível em:

<http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2018.

FIRKINS, J. L. et al. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 81, p. 3350-3369, 1998.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. 1977. Thesis (Ph. D.) - Michigan State University, East Lansing, MI, USA, 1977.

FRASER, G. R. et al. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, p. 2315-2328, 2007.

FIRKINS, J. L. et al. Modeling ruminal digestibility of carbohydrates microbial protein flow to the duodenum. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, p. 3350-3369, 1998.

FUGITA, C. A. **Aditivos naturais na dieta de bovinos (Angus vs. Nelore) terminados em confinamento**. 2013. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013

GARCÍA, P. et al. Potential of carvacrol to modify in vitro rumen fermentation as compared with monensin. **Animal**, Cambridge, n. 5, p. 675-680, 2007.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food Science**, Hoboken, v. 76, n. 2, p. 95-100, 2011.

GETACHEW, G. et al. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 261-281, 1998.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 139, p. 341-352, 2002.

GRIFFIN, S. G. et al. 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.

HOOK, S. E.; WRIGHT, A. D. G.; MCBRIDE, B.W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Hindawi Publishing Corporation**, New York, v. 2010, p. 1-11, 2010.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of *origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 96, p. 1189-1202, 2013.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE - IPCC. **Guidelines for national greenhouse gas inventories**. IPCC 2006, 2006. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.html>>. Acesso: 28 jan. 2018.

_____. **Climate change 2007: the physical science basis**. In: WORKING GROUP I TO THE FOURTH ASSESSMENT REPORT OF THE INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE, 2007. Cambridge: University Press, 2007.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, São Leopoldo, v. 5, p. 120-132, 2010.

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

KLEVENHUSEN, F. et al. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 176, p. 61-69, 2012.

KULASEK, G. A. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood cells using urease and phenol reagent. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, Poland, v. 15, p. 81-810, 1972.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Chichester, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LONGO, C. et al. The influence of head space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. In: SOLIVA C. R.; TAKAHASHI, J.; KREUZER. (Ed.). **Greenhouse gases and animal agriculture: an update**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p. 62-65. (Int. Congr. Series n. 1293).

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, p. 24-35, 2009.

MARTINEZ, S. et al. 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, p. 6598-6602, 2006.

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.

McALLISTER, A. T. et al. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 231-243, 1996.

MEALE, S. J. et al. Including essential oils in ruminal batch cultures, or in diets fed to lactating dairy cows: effects on methane emissions. In: In: GREENHOUSE GASES AND ANIMAL AGRICULTURE CONFERENCE, 4., 2010, Banff. **Proceedings...** Banff, 2010. p. 136.

MEYER, N. F. et al. Effect of essential oils, thylosin and monensin, on finishing steer performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation and digestibility. **Journal of Animal Science**, Cary, v. 87, p. 2346-2354, 2009.

MACHEBOEUF, D. et al. Dose-response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, p. 335-350, 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. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 5011-5014, 2003.

MILLER, T. L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHARDT, W. V. et al. (Ed.). **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction**. Ferdinand: Enke Verlag, 1995. p. 317-332.

MOHAMMED, N. et al. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. **Journal of Animal Science**, Cary, v. 82, n. 6, p. 1839-1846, 2004.

NAIK, M. I. et al. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Mumbai, v. 3, p. 535-538, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrients requirements of beef cattle**. 7th ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996. 242 p.

NEWBOLD, C. J. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam v. 114, p. 105-112, 2004.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 71, p. 2051-2069, 1988.

OH, H. K. et al. 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

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS NO BRASIL - ONU BR. **População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU**. Brasil, 13 jun. 2013. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-atingir-96-bilhoes-em-2050-diz-novo-relatorio-da-onu/>>. Acesso em: 05 fev. 2016.

_____. **Se o atual ritmo de consumo continuar em 2050 o mundo precisará de 60% mais alimentos e 40 % mais água**. Brasil, 21 jan. 2015. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/fao-se-o-atual-ritmo-de-consumo-continuar-em-2050-mundoprecisara-de-60-mais-alimentos-e-40-mais-agua/>>. Acesso em: 05 fev. 2016.

ØRSKOV, E. R. **Nutrición proteica de los ruminantes**. Zaragoza: Acribia, 1988. 178 p.

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

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, n. 12, p. 4271-4280, 2012.

PAWAR, M. M. et al. Effects of essential oil on in vitro methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor. **Agricultural Research**, Heidelberg, v. 3, p. 67-74, 2014.

PEREIRA, L. G. R. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, Medellín, v. 26, p. 264-277, 2013.

PRESTON, T. R.; LENG, R. A. Sulphur nutrition of ruminants. In: PRESTON, T. R.; LENG, R. A. (Ed.). **Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics**. Armidale: Penambul Books, 1987. p. 46-47.

PRIMAVESI, O. et al. Produção de gases de efeito estufa em sistemas agropecuários: bases para inventário de emissão de metano por ruminantes. In: LIMA, M. A. et al. (Org.). **Estoques de C e emissões de gases de efeito estufa na agropecuária brasileira**. Brasília, DF: Embrapa, 2002. cap. 8, p. 239-270.

PWC. **The world in 2050**. Disponível em: <<https://www.pwc.com/gx/en/issues/the-economy/assets/world-in-2050-february-2015.pdf>>. Acesso em: 05 fev. 2018.

RIVAROLI, D. C. **Níveis de óleos essenciais na dieta de bovinos de corte terminados em confinamento**: desempenho, características da carcaça e qualidade da carne. 2014. 84 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T et al. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim tifton-85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. 3, p. 617-624, 2010.

RUSSEL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 604-610, 1980.

RUSSELL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its

potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

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

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

RUSSO, M. et al. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis: 1. Inflorescences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, p. 3741-3746, 1998.

SALMAN, A. K. D. et al. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010. 26 p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 136).

SALLAM, S. et al. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission in vitro. **Italian Journal of Animal Science**, Abingdon, v. 9, p. 299-303, 2010.

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

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre, RS: UFSC, 2004.

SATTER, L.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration rumen microbial protein production *in vitro*. **The British Journal Nutrition**, Cambridge, v. 32, n. 2, p. 199-208, 1974.

SENATORE, F. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 44, p. 1327-1332, 1996.

SIMÕES, C. M. D. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104p.

SIMÕES, C. M.; SPITZEER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2004.

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

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

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

THEODOROU, M. K. et al. 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, p. 185-197, 1994.

THORPE, A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climatic Change**, Dordrecht, v. 93, p. 407-431, 2009.

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.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Evaluating ruminant livestock efficiency projects and programs. In: _____. **Peer review draft**. Washington. D.C.: USEPA, 2000. 48 p.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Ruminant livestock**. Washinfon: EPA, 2004. Disponível em: <<http://www.epa.gov/rlep/sustain.htm>>. Acesso: 13 mar. 2018.

VAKILI, A. R. et al. The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in holstein calves consuming high concentrate diet. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 26, n. 7, p. 935-944, 2013.

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

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. London. Constock Publishing Associates, USA, 1994. 476 p.

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

WANAPAT, M. et al. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogum citratus* Stapf.) powder supplementation. **Journal of Animal Science**, Cary, 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.

WESTBERG, H. H. et al. A SF₆ tracer technique: methane measurement from ruminants. In: USEPA. **Evaluating ruminant livestock efficiency projects and programs**. Washington: Washington State University, Pullman, 1998. 40 p.

ZEBELI, Q. et al. Invited review: role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, p. 1041-1056, 2012.

APÊNDICES

Apêndice 1. Cromatograma do óleo essencial de anis estrelado (*Illicium verum*)

Apêndice 2. Cromatograma do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*)

Apêndice 3. Cromatograma do óleo essencial de cravo botão (*Eugenia caryophyllus*)

Apêndice 4. Cromatograma do óleo essencial de eucalipto globulus (*Eucalyptus globulus*)

Apêndice 5. Cromatograma do óleo essencial de eucalipto staigeriana (*Eucalyptus staigeriana*)

Apêndice 6. Cromatograma do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*)

Apêndice 7. Cromatograma do óleo essencial de ho wood (*Cinnamomun camphora* var. *Linalooliferum*)

Apêndice 8. Cromatograma do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

Apêndice 9. Cromatograma do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

Apêndice 10. Cromatograma do óleo essencial de tomilho branco (*Thymus vulgaris*)