

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LARANJA E CRAVO
EM RAÇÕES DE RUMINANTES UTILIZANDO SISTEMAS *IN*
VITRO

Autor: Micheli Regiani Sippert

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

MARINGÁ

Estado do Paraná

2019

AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LARANJA E CRAVO
EM RAÇÕES DE RUMINANTES UTILIZANDO SISTEMAS *IN*
VITRO

Autora: Micheli Regiani Sippert
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação e Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção animal

MARINGÁ

Estado do Paraná

Março - 2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

S618a Sippert, Micheli Regiani
Avaliação de óleos essenciais de laranja e cravo em rações de ruminantes utilizando sistemas *in vitro* / Micheli Regiani Sippert. -- Maringá, PR, 2019. vii, 35 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.
Coorientador: Prof. Dr. João Luis Pratti Daniel.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2019.

1. Extratos de plantas. 2. Fermentação ruminal. 3. Aditivos alimentares. 4. Antimicrobiano. 5. Nitrogênio amoniacal. I. Santos, Geraldo Tadeu dos, orient. II. Daniel, João Luis Pratti, orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.2

Márcia Regina Paiva de Brito - CRB-9/1267




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS


AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LARANJA E
CRAVO EM RAÇÕES DE RUMINANTES UTILIZANDO
SISTEMAS *IN VITRO*

Autora: Micheli Regiani Sippert
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 08 de março de 2019.


Prof. Dr. Maximiliane Alavarse
Zambom


Dr. Francilaine Eloise De Marchi


Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Orientador

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor, incentivo e apoio incondicional;

à Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por possibilitar a realização deste trabalho;

à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de estudos;

ao professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, pela oportunidade, por toda orientação, ensinamentos e amizade;

ao professor Dr. João Luiz Pratti Daniel, pela coorientação, apoio e disponibilidade;

aos colegas de grupo Nupel - Monique Figueiredo, Karoline Guimarães, Francilaine Eloise de Marchi, Jakeline Fernandes Cabral, Jesus Alberto Cardozo Osório, Jean Carlos Steinmacher, Kleves Vieira de Almeida e Thomer Durman;

aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial aos funcionários do Setor de Ensino, Pesquisa e Extensão em Bovinocultura de Leite;

a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MICHELI REGIANI SIPPERT, filha de Oldemar Sippert e Marli Ingrid Sippert, nasceu em Condor, Rio Grande do Sul, no dia 15 de fevereiro de 1994.

Em março de 2011, ingressou no curso de Zootecnia, pela Universidade Federal de Santa Maria, *campus* de Palmeira das Missões.

Em dezembro de 2016, concluiu o curso de Zootecnia, pela Universidade Federal de Santa Maria.

Em março de 2017, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, nível de Mestrado, área de concentração Produção animal, na Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
ADITIVOS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES	4
ÓLEOS ESSENCIAIS	6
ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO E DE LARANJA	8
AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS <i>IN VITRO</i>	9
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LARANJA E CRAVO EM RAÇÕES DE RUMINANTES UTILIZANDO SISTEMAS <i>IN VITRO</i>	18
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO	18
MATERIAL E MÉTODOS	20
<i>Experimento 1 – Dieta Leite</i>	20
<i>Experimento 2 – Dieta Corte</i>	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
<i>Experimento 1 – Dieta Leite</i>	25
<i>Experimento 2 – Dieta Corte</i>	28
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição química dos ingredientes utilizados nas rações.....	20
Tabela 2. Composição da dieta experimental para bovinos leiteiros.....	21
Tabela 3. Composição da dieta experimental para bovinos de corte.....	25
Tabela 4. Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca 24 horas (DIVMS), da fibra em detergente neutro 24 horas (FDN), potencial hidrogeniônico em 12 e 24 horas (pH) e nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) da dieta leite com diferentes tipos e níveis de OE.....	27
Tabela 5. Parâmetros cinéticos de fermentação ruminal (B = volume total de gás, C = taxa de produção de gás, L = <i>lag phase</i> , FP = Fator de Partição) para a dieta leite com diferentes tipos e níveis de OE.....	27
Tabela 6. Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca 24 horas (DIVMS), da fibra em detergente neutro 24 horas (FDN), potencial hidrogeniônico em 12 e 24 horas (pH) e nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) da dieta corte com diferentes tipos e níveis de OE.....	30
Tabela 7. Parâmetros cinéticos de fermentação ruminal (B = volume total de gás, C = taxa de produção de gás, L = <i>lag phase</i> , FP = Fator de Partição) para a dieta corte com diferentes tipos e níveis de OE.....	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais sobre as bactérias ruminais. Adaptado de Burt (2004)	7
Figura 2. Estruturas químicas do eugenol e do limoneno.....	8
Artigo	
Figura 1. Curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás/ 100 mg de MS incubada da dieta leite com diferentes tipos e níveis de OE.....	28
Figura 2. Curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás/ 100 mg de MS incubada da dieta corte com diferentes tipos e níveis de OE.....	31

RESUMO

Óleos essenciais (OE) podem ser utilizados como aditivos naturais na nutrição de ruminantes, com o propósito de melhorar a eficiência de fermentação ruminal, de síntese proteica e manutenção do pH ruminal. Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a inclusão de óleos essenciais em simulações *in vitro* sobre diversos parâmetros de fermentação ruminal, como o pH, degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN), níveis de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e parâmetros de cinética ruminal. Os tratamentos foram avaliados simulando dietas com diferentes tipos e proporções de concentrado e volumoso. Foram testados em simulações *in vitro* óleo essencial de cravo (OC) e de laranja (OL) em diferentes dosagens sobre duas dietas diferentes (dieta com 80% - corte e 50% de concentrado - leite). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial (2X3) para cada dieta. Os dados obtidos foram comparados com teste de médias (Tukey) e adotou-se $\alpha = 0,05$ de probabilidade. Quando houve efeito do nível e do óleo essencial ou da interação entre os dois, foram analisados através de contrastes. A inclusão de OC manteve os valores de DIVMS nas duas dietas, enquanto o OL reduziu a DIVMS somente no tratamento com menor teor de concentrado. Os teores de N-NH₃ foram menores em relação ao controle no nível de 400 mg/L de fluido ruminal tamponado dos dois OE, para a dieta leite. Na dieta com maior teor de concentrado, os valores médios foram inferiores ao controle em todos os tratamentos, com valores mais baixos para a dosagem de 200 mg/L de fluido ruminal tamponado. Em relação aos parâmetros de cinética ruminal, a adição de OE aumentou o volume total de gás produzido, com o aumento mais significativo para OL na dieta leite. Quanto ao fator de partição (FP), o mesmo foi reduzido em relação ao controle na dieta leite, e foi superior ao controle na dieta corte para os menores níveis de inclusão dos OE (100 e 200 mg/L fluido ruminal tamponado). Assim, a inclusão de óleos essenciais pode melhorar a

utilização de nitrogênio no rúmen, sem afetar a fermentação ruminal para os óleos e níveis de inclusão analisados.

Palavras-chave: extratos de plantas, fermentação ruminal, aditivos alimentares, antimicrobiano, nitrogênio amoniacal

ABSTRACT

Essential oils (OE) can be used as natural additives in ruminant nutrition, to improve the rumen fermentation efficiency, protein synthesis and ruminal pH maintenance. The objective of this study was to evaluate the essential oils inclusion in in vitro simulations on various ruminal fermentation parameters such as pH, in vitro dry matter degradability (DIVMS), in vitro neutral detergent fiber degradability (DIVFDN), ammoniacal nitrogen levels (N-NH₃) and ruminal kinetic parameters. The treatments were evaluated simulating diets with different types and proportions of concentrate and bulk. Clove essential oil (OC) and orange (OL) were tested in different simulations on two different diets (80% - Meat diet and 50% concentrate – Milk diet). The experimental design was completely randomized with factorial (2X3) for each diet. The data were compared with the Tukey test and $\alpha = 0.05$ probability was used. When there was an effect of the level and the essential oil or the interaction between them, they were analyzed through contrasts. The OC inclusion maintained the values in both diets, while OL reduced DIVMS only in the treatment with lower concentrate content. The N-NH₃ contents were lower in relation to the control at the 400 mg/L level of ruminal fluid buffered with the two OE, for the dairy diet. In diet with higher concentrate content (beef), mean values were lower than control in all treatments, with lower values for the dosage of 200 mg / L of buffered ruminal fluid. In relation to ruminal kinetic parameters, the OE addition increased the total volume of gas produced, with the most significant increase for OL in the Milk diet. Regarding the partitioning factor (FP), it was reduced in relation to control in milk diet, and was superior to control in beef diet for the lower OE inclusion levels (100 and 200 mg / L buffered ruminal fluid). Thus, the essential oils inclusion can improve the nitrogen use in rumen, without affecting ruminal fermentation for the oils and inclusion levels analyzed.

Keywords: plants extracts, ruminal fermentation, feed additive, antimicrobial, ammonia

INTRODUÇÃO

A produção animal brasileira está se desenvolvendo constantemente para garantir a oferta de alimentos à população brasileira e mundial, visto à crescente demanda por estes produtos. Entretanto, principalmente os ruminantes, se tornaram alvos de críticas pela alta demanda de recursos naturais, área de terras e poluição ambiental, sendo considerado em geral como os maiores responsáveis pela emissão de poluentes no ar e no solo. Considerando-se que a agropecuária brasileira tende a crescer nos próximos anos, é importante modificar e melhorar os meios de produção de maneira a intensificar os sistemas de produção com sustentabilidade ambiental e econômica (de Oliveira Caetano & Júnior, 2016).

O que caracteriza os ruminantes essencialmente é a presença do rúmen. O rúmen é um compartimento do estômago dos ruminantes que tem como características principais a anaerobiose, presença de microrganismos como bactérias, fungos e protozoários em grande quantidade, fermentação e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Várias pesquisas são realizadas tendo o rúmen e suas características como objetivo de estudo; estas têm buscado modificar o ambiente ruminal com o objetivo de reduzir os impactos ambientais e melhorar a produtividade dos animais. A manipulação da fermentação ruminal pode melhorar o aproveitamento de alimentos nobres ou subprodutos pelos ruminantes.

A manipulação da fermentação por meio de aditivos alimentares é uma estratégia para melhorar a saúde animal, reduzindo desordens metabólicas (Plaizier et al., 2018; dos Santos, Silva-kazama, Kazama, & Petit, 2010) e otimizando a utilização de nutrientes dos alimentos (McCann, Elolimy, & Loor, 2017). O uso de aditivos na dieta como ionóforos é utilizado para modificar a fermentação ruminal e assim reduzir a produção de metano, perdas de nitrogênio e melhorar a eficiência alimentar. Contudo, o uso destes produtos está proibido na União Europeia desde 2006, pela preocupação da população em consumir produtos livres de aditivos químicos que se estende ao resto do mundo, ainda não de maneira proibitiva. Uma alternativa

que vem sendo desenvolvida desde então é a utilização de óleos essenciais, que são compostos secundários de plantas com diversos componentes ativos (Tedeschi et al., 2017).

Os óleos essenciais são potenciais moduladores da fermentação ruminal, constituídos por substâncias que podem reduzir a metanogênese, aumentar a produção de ácido propiônico, reduzir a degradação proteica, melhorar a síntese de proteína microbiana e inibir a atividade de alguns protozoários (Asmare, 2014). Esses compostos também podem reduzir a emissão de metano e amônia no ambiente, entretanto há resultados inconsistentes para a degradabilidade de alimentos e desconhecimento sobre os mecanismos de atuação no ambiente ruminal (Cobellis, Trabalza-Marinucci, & Yu, 2016)

Dentre os óleos essenciais mais estudados e já utilizados como aditivos para ruminantes está o óleo essencial de cravo, que possui como principal componente o eugenol, com atividade antimicrobiana, anestésica e antioxidante (Scherer, Wagner, Duarte, & Godoy, 2009), já utilizado em várias formulações comerciais. Outro óleo essencial com potencial é o óleo essencial de laranja, que pode ser produzido no Brasil em larga escala, derivado da cadeia de produção de sucos de laranja. O óleo essencial de laranja extraído do pericarpo da fruta, com o limoneno como principal componente ativo, ainda é pouco estudado para ruminantes (Bizzo, Hovell, & Rezende, 2009).

Estes aditivos naturais ao exemplo de outros aditivos promissores são extensivamente testados em simulações *in vitro*, pela grande quantidade de óleos essenciais e possibilidades de combinações (Calsamiglia, Busquet, Cardozo, Castillejos, & Ferret, 2007b) Metodologias *in vitro* de avaliação de alimentos e aditivos são uma alternativa mais viável do que o uso de animais, pois é mais barato, rápido e menos invasivo. A combinação de métodos de avaliação de alimentos e aditivos *in vitro* é importante para estimar os possíveis efeitos na fermentação ruminal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ADITIVOS NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

Ruminantes são animais reconhecidos pela sua capacidade de converter forrageiras de baixa qualidade não utilizadas como alimentos para humanos de alto valor nutricional como carne e leite, (McCann et al., 2017). Essa conversão e produção de alimentos é mais eficiente quando é oferecido aos ruminantes alimentação balanceada. Além da adequada proporção de ingredientes e suprimento de nutrientes, o fornecimento de aditivos é uma ferramenta importante para a manutenção da saúde ruminal, crescimento, reprodução e produção dos animais.

Entre os aditivos alimentares mais usados estão os ionóforos, principalmente a monoensina, amplamente reconhecida como modificador ruminal, utilizada para reduzir a incidência de doenças típicas do período de transição de vacas leiteiras, além de potencial redução da emissão de metano (dos Santos et al., 2010). A produção de metano tem uma relação negativa com a eficiência alimentar e utilização de energia pelos ruminantes, além dos prejuízos ecológicos da emissão de metano na atmosfera (Pirondini et al., 2014), justificando os esforços de pesquisas para reduzir a emissão de metano pelos ruminantes.

Outros aditivos bastante utilizados na nutrição de ruminantes são os prébióticos, probióticos e enzimas, especialmente com o objetivo de melhorar a degradação e utilização de fibras provenientes de volumosos de baixa qualidade (Asmare, 2014). Leveduras, principalmente derivadas de culturas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* strains, são adicionadas às rações para controle de pH, melhoria na degradação da fibra, além da utilização dos produtos de fermentação pelos animais (Plaizier et al., 2018). Para vacas em período de transição ou de alta produção, leveduras são incluídas na alimentação pelo potencial

de controle do pH ruminal, com o objetivo de reduzir a incidência de acidose subaguda (Hasunuma, Uyeno, Akiyama, & Hashimura, 2016).

Apesar da proibição da União Europeia, em 2006, e dos questionamentos de pesquisadores e consumidores, o uso da monoensina e outros ionóforos ainda é permitido nos Estados Unidos, Brasil, Argentina e outros países (De Marchi et al., 2015). O uso de antibióticos tanto para tratamento como prevenção e também como promotores de crescimento em animais de produção é associado ao desenvolvimento de espécies de bactérias resistentes a antibióticos (Centner, 2016), que podem ser extremamente prejudiciais à saúde humana. A possibilidade de presença de resíduos no leite, carnes e outros produtos, cogitado como uma das possíveis fontes de bactérias resistentes aos humanos é uma questão que perturba os consumidores (Tedeschi et al., 2017)

Os aditivos naturais são uma alternativa aos antibióticos, sem os efeitos adversos como resíduos e microrganismos resistentes (Valenzuela-grijalva, Pinelli-saavedra, Muhlia-almazán, Domínguez-díaz, & González-ríos, 2017). Estes aditivos podem ser utilizados na forma natural ou a partir do princípio ativo puro, dependendo dos mecanismos de ação e outros compostos presentes que podem atuar de forma sinérgica (Kholif et al., 2018). Alguns exemplos de aditivos naturais já testados: própolis (de Aguiar et al., 2013; Valero et al., 2014; Yoshimura et al., 2018), taninos e saponinas (Mandal, Roy & Patra, 2016), extratos de plantas (Bhatt, 2015) e óleos essenciais (Tager & Krause, 2011).

Ao longo das últimas décadas, aumentou-se o interesse por óleos essenciais e seus compostos ativos por parte de pesquisadores e da indústria de nutrição animal, por suas características antimicrobianas (Hallier et al., 2013). Esses compostos vêm sendo analisados para a inclusão na alimentação de ruminantes e não ruminantes (Zeng, Zhang, Wang, & Piao, 2015). A inclusão destes extratos vegetais é indicada por vários autores como uma alternativa interessante para a substituição de antibióticos (Benchaar et al., 2012; Yang et al., 2010), pela sua eficiência na modificação da fermentação ruminal e segurança na utilização. Nos Estados Unidos, a entidade de regulamentação federal (Food and Drug Administration - FDA 25 (21CFR182.20) (2013) estabelece que os óleos essenciais e extratos naturais são reconhecidos como seguros para o uso (GRAS – Generally Recognized as Safe).

ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são metabólitos secundários de plantas, responsáveis pelo cheiro das plantas, encontradas na casca, folhas, frutos e sementes, podendo ter composição diferente entre as partes das plantas e local de extração. Na natureza, têm a função de proteger as plantas contra a ação de predadores e microrganismos patogênicos, e também têm o papel de sinalizador químico, para atrair polinizadores e aves dispersoras de sementes (Oliveira; & Igarasi, 2013). São substâncias lipofílicas, líquidas e voláteis, obtidas geralmente por destilação a vapor, com água, álcool ou solventes (Hart, Yáñez-Ruiz, Duval, McEwan, & Newbold, 2008).

Os principais óleos essenciais são divididos em dois grupos químicos: terpenoides (monoterpenos e sesquiterpenos) e fenilpropanoides. Estes dois grupos originam-se de diferentes precursores do metabolismo primário das plantas e são sintetizados por diferentes rotas metabólicas (Calsamiglia et al., 2007b). Óleos essenciais podem conter de 20 a 30 componentes diferentes, como álcoois, aldeídos, hidrocarbonos, ésteres e éteres (Benchaar et al., 2008).

Óleos essenciais têm sido utilizado por séculos pelos humanos como fragrâncias, repelentes e na medicina à base de plantas. Com o advento das drogas sintéticas, compostos naturais foram sendo deixados de lado, no entanto com o surgimento das bactérias resistentes aos antibióticos renovou-se o interesse nesses compostos, por suas propriedades antimicrobianas (Benchaar et al., 2008). Atualmente, os óleos essenciais também são utilizados como conservantes na indústria de alimentos, para carnes (Jayasena & Jo, 2013), queijos (Khorshidian, Yousefi, Khanniri, & Mortazavian, 2018) e outros alimentos.

Na nutrição de ruminantes, os óleos essenciais, especificamente compostos de limoneno e pineno, foram testados e provados como potenciais inibidores de metano por Crane, Nelson e Brown (1957). Logo após, foi encontrado que o timol inibia a deaminação ruminal pelo acúmulo de aminoácidos e queda na concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$). O interesse pelos óleos essenciais diminuiu com o surgimento dos ionóforos na década de 70, e retornou mais recentemente com o anúncio da proibição de promotores de crescimento pela União Europeia (Canoneco de Araujo, 2010).

Especificamente sobre a microbiota ruminal, há diversos supostos mecanismos de ação, com atividade antioxidante, antisséptica e antimicrobiana em diversos níveis (Cobellis, Trabalza-Marinucci, & Yu, 2016). Sobre os diversos microrganismos ruminais (Figura 1), os

óleos essenciais atuam danificando a membrana proteica e citoplasmática, coagulando o citoplasma, destruindo a parede celular e assim aumentando a permeabilidade celular (Khorshidian et al., 2018). Como o óleo é hidrofóbico, pode romper a membrana citoplasmática, aumentando a permeabilidade e facilitando o extravasamento do conteúdo citoplasmático.

O mecanismo de atuação dos óleos essenciais sobre a microbiota ruminal é estudado a alguns anos, principalmente por meio de estudos *in vitro*, que podem apresentar resultados diferentes do *in vivo* (Castro-Montoya et al., 2015). Sabe-se que estes compostos podem ser tóxicos às bactérias gram-positivas e gram-negativas (incluindo as metanogênicas) resultando em peptidólise, deaminação e metanogênese reduzida (Calsamiglia et al., 2007a; Calsamiglia, Ferret, Reynolds, Kristensen, & Van Vuuren, 2010), e também aos protozoários (Patra, Park, Kim, & Yu, 2017).

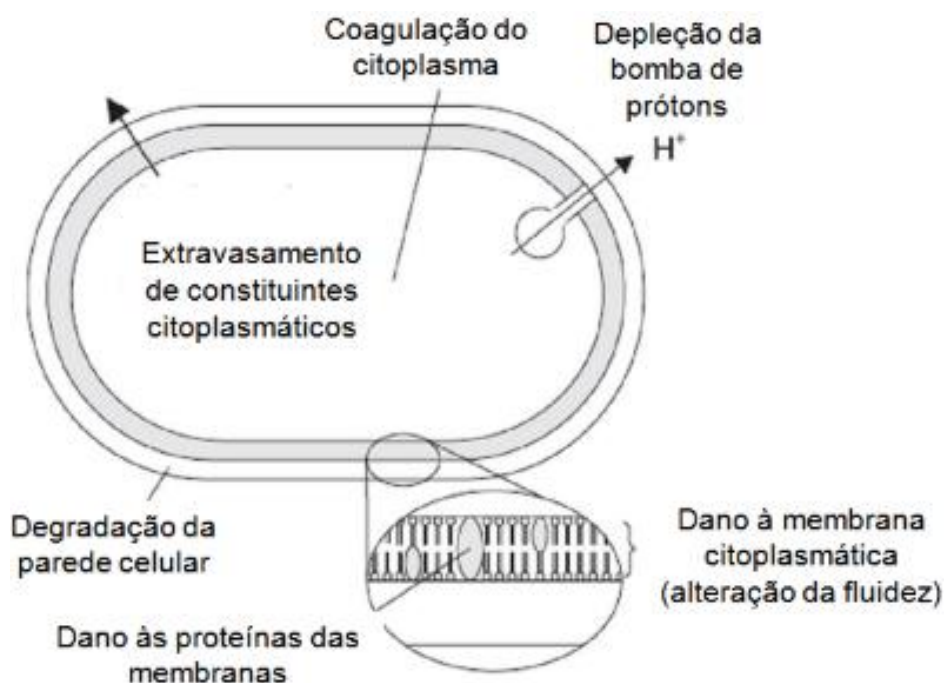


Figura 1. Possíveis mecanismos de atuação dos óleos essenciais sobre as bactérias ruminantes.

Fonte: Burt (2004)

ÓLEOS ESSENCIAIS DE CRAVO E DE LARANJA

O Brasil tem uma grande produção de matéria-prima para óleos essenciais (Matilha, Filho, & Wolff, 2008), e um potencial a ser desenvolvido para a extração de óleos essenciais, seja a partir de grandes culturas comerciais (como a laranja e o limão) assim como de plantas nativas do Brasil (Hosseini Jahani-Azizabadi, 2011). O país está entre um dos maiores produtores mundiais de óleos essenciais, devido, principalmente, à produção de frutas cítricas (Bizzo et al., 2009).

O óleo essencial de cravo (*Eugenia spp.*), constituído de aproximadamente 50% de eugenol (Hu & Zhou, 2018), talvez um dos compostos mais estudados como modulador de fermentação ruminal, é um fenilpropanoide com ampla atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Busquet, Calsamiglia, Ferret, & Kamel, 2006; Marchese et al., 2017). Já o óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis L.*), obtido a partir da polpa cítrica, é composto por mais de 90% de limoneno, um monoterpreno, com atividade antibacteriana principalmente contra bactérias gram-negativas (Benchaar et al., 2008; Castillejos, Calsamiglia, & Ferret, 2006). Na Figura 2, estão ilustradas as estruturas químicas do eugenol e do limoneno.

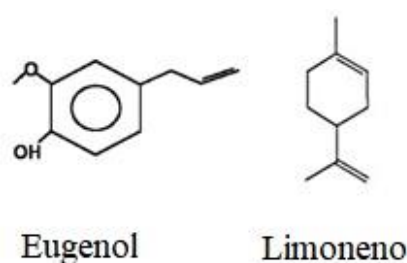


Figura 2. Estruturas químicas do eugenol e do limoneno.
Fonte: Canoneco de Araujo, 2010

Günel et al. (2017) observaram resultados positivos em testes realizados *in vitro* com a adição de óleos essenciais como o de cravo, com a redução da produção de metano sem impactos negativos na fermentação ruminal. Quanto aos trabalhos, analisando o componente principal puro, Roy, Tomar, & Kumar (2015) encontraram resultados indicando que o eugenol teve um efeito antimicrobiano potencial mais efetivo do que outros compostos não fenólicos pela presença de um grupo hidroxila na estrutura fenólica, causando danos na membrana celular das bactérias.

Enquanto isso, a maioria da literatura existente explora o efeito de misturas contendo limoneno, com menos informação sobre o composto puro (Klevenhusen, Muro-reyes, Khiaosard, Metzler-zebeli, & Zebeli, 2012). Os trabalhos existentes com limoneno indicam redução da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro e produção de metano com dosagens mais altas, 30 mg/g de dieta, (M. Cattani, Mantovani, Schiavon, Bittante, & Bailoni, 2014).

As dosagens de óleos essenciais para efeitos positivos na fermentação ruminal ainda não estão bem estabelecidas, com resultados em pesquisa controversos e poucos avanços no entendimento do modo de ação destes aditivos (Shabestari et al., 2011; Benchaar et al., 2015; Cobellis et al., 2016).

AValiação DE ALIMENTOS *IN VITRO*

A determinação da degradabilidade de um alimento é fundamental para seu uso em formulação de rações para ruminantes, assim como o efeito de aditivos sobre a mesma. Diversas metodologias foram desenvolvidas ao longo do tempo, com seus aspectos positivos e negativos e diversas finalidades. Todas as metodologias que utilizam material ruminal requerem prévia adaptação alimentar do animal, para que a microbiota ruminal seja compatível com o alimento avaliado. O método *in vivo*, por exemplo, por utilizar grande número de animais é o método mais confiável, mas também o mais dispendioso, pois os animais devem permanecer em baias ou gaiolas metabólicas com coleta total de fezes e urina separadamente. Na maioria dos casos a dieta é composta por mais de um ingrediente; deve-se usar o método da diferença para determinar a digestibilidade de um ingrediente específico.

Mehrez & Orkov (1977) desenvolveram a metodologia de degradabilidade ruminal *in situ* dos alimentos, utilizando sacos de náilon colocados diretamente no rúmen de um animal canulado. As cânulas são implantadas no rúmen ou duodeno do animal cirurgicamente, a fim de se obter acesso para inserir amostras ou coletar material. O método avalia o desaparecimento da amostra de alimento colocada em sacos de material sintético incubada no rúmen por diferentes períodos de tempo.

As técnicas de degradabilidade *in vitro* (e degradabilidade) vêm sendo aperfeiçoadas constantemente a fim de representar da melhor maneira possível o que ocorre no rúmen. A metodologia de Tilley & Terry (1963) é uma das pioneiras e mais utilizadas; consiste em incubações em tubos de digestibilidade com líquido ruminal, substrato, solução tampão e CO₂, mantidos em agitação e temperatura constante (39°C). O tempo de incubação varia de acordo com o substrato, de 24 horas para alimentos concentrados e até 96 horas para forrageiras.

Para um estudo mais detalhado da cinética de degradação ruminal, o método de produção de gás, descrito por Mauricio et al., (1999), é interessante, pois estima-se a digestibilidade do alimento correlacionando-se à produção microbiana de gás e à matéria orgânica fermentada. Com a automatização do sistema, é possível obter medições em menores intervalos de tempo e com maior precisão, sendo possível avaliar alimentos e aditivos (Díaz et al., 2018). A combinação de várias técnicas para avaliar aspectos diferentes da degradabilidade ruminal é a melhor forma de obter resultados similares aos encontrados *in vivo*, também porque há diversos fatores externos que podem ser controlados quando avaliamos digestibilidade *in vitro*.

Em relação aos aditivos e especificamente óleos essenciais, estudos *in vitro* são úteis para avaliar uma grande variedade de aditivos e sua influência na fermentação ruminal, com algumas limitações. É necessário utilizar uma dosagem maior do que seria utilizada *in vivo*, para melhorar a probabilidade de interação entre o aditivo e os microrganismos ruminais (Calsamiglia et al., 2007a). Além disso, incubações de curto tempo podem não ser suficientes para apresentar os efeitos dos óleos essenciais na fermentação ruminal. Tempos maiores de incubação como de 48 horas podem levar à deterioração dos microrganismos ruminais (Castillejos, Calsamiglia, Martín-Tereso, & Ter Wijlen, 2008).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ara, G., Caetano, O., & Caetano, M. B. (2017). O estado da arte da nutrição de ruminantes. *Pubvet*, 11(4), 399–408.
- Asmare, B. (2014). Biotechnological Advances for Animal Nutrition and Feed Improvement. *World Journal of Agricultural Research*, 2(3), 115–118. <https://doi.org/10.12691/wjar-2-3-5>
- Baraka, T. A. M., & Abdl-Rahman, M. A. (2012). In vitro evaluation of sheep rumen fermentation pattern after adding different levels of eugenol - fumaric acid combinations. *Veterinary World*, 5(2), 110–117. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.110-117>
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A., & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1–4), 209–228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Benchaar, C., Hassanat, F., & Petit, H. V. (2015). Dose-response to eugenol supplementation to dairy cow diets: Methane production, N excretion, ruminal fermentation, nutrient digestibility, milk production, and milk fatty acid profile. *Animal Feed Science and Technology*, 209, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.07.027>
- Bhatt, N. (2015). Herbs and Herbal Supplements , a Novel Nutritional Approach in Animal Nutrition. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 5, 497–516.
- Bizzo, H. R., Hovell, A. M. C., & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32(3), 588–594. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>

- Bueno, I. C. S., Vitti, D. M. S. S., Louvandini, H., & Abdalla, A. L. (2008). A new approach for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, *141*(1–2), 153–170.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.011>
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Plant Extracts Affect In Vitro Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, *89*(2), 761–771.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72137-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72137-3)
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007a). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, *90*(6), 2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007b). Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, *90*(6), 2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Reynolds, C. K., Kristensen, N. B., & Van Vuuren, A. M. (2010). Strategies for optimizing nitrogen use by ruminants. *Animal*, *4*(7), 1184–1196.
<https://doi.org/10.1017/S1751731110000911>
- Canoneco de Araujo, R. (2010). *Óleos Essenciais De Plantas Brasileiras Como Manipuladores Da Fermentação Ruminal in Vitro*. Universidade de São Paulo.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in In Vitro Systems. *Journal of Dairy Science*, *89*(7), 2649–2658. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72341-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-4)
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martín-Tereso, J., & Ter Wijlen, H. (2008). In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science and Technology*, *145*(1–4), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.037>
- Castro-Montoya, J., Peiren, N., Cone, J. W., Zweifel, B., Fievez, V., & De Campeneere, S. (2015). In vivo and in vitro effects of a blend of essential oils on rumen methane mitigation. *Livestock Science*, *180*, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.08.010>
- Cattani, M., Mantovani, R., Schiavon, S., Bittante, G., & Bailoni, L. (2014). Recovery of n-3

- polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acids in ripened cheese obtained from milk of cows fed different levels of extruded flaxseed. *Journal of Dairy Science*, 97(1), 123–135. <https://doi.org/10.3168/JDS.2013-7213>
- Cattani, Mirko, Maccarana, L., Rossi, G., Tagliapietra, F., Schiavon, S., & Bailoni, L. (2016). Dose-response and inclusion effects of pure natural extracts and synthetic compounds on in vitro methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 218(June), 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.014>
- Centner, T. J. (2016). Recent government regulations in the United States seek to ensure the effectiveness of antibiotics by limiting their agricultural use. *Environment International*, 94, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.04.018>
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., Marcotullio, M. C., & Yu, Z. (2016). Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 215, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.008>
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., & Yu, Z. (2016). Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545–546, 556–568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>
- de Aguiar, S. C., Zeoula, L. M., Franco, S. L., Peres, L. P., Arcuri, P. B., & Forano, E. (2013). Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(10), 1951–1959. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1361-x>
- Díaz, T. G., Branco, A. F., Carlos, L., Ítavo, V., Tadeu, G., Carvalho, S. T., & Teodoro, A. L. (2018). In vitro gas production kinetics and digestibility in ruminant diets with different levels of cashew nut shell liquid Cinética da produção de gases e digestibilidade in vitro em dietas para ruminantes com diferentes níveis de líquido de casca de castanha , 1669–1682. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n4p1669>
- dos Santos, G. T., Silva-kazama, D. C., Kazama, R., & Petit, H. V. (2010). Revista Brasileira de Zootecnia Scientific progress in ruminant production in the 1 st decade of the XXI century, 2010, 478–490.
- Gunal, M., Ishlak, A., AbuGhazaleh, A. A., & Khattab, W. (2014). Essential oils effect on

- rumen fermentation and biohydrogenation under *in vitro* conditions. *Czech Journal of Animal Science*, 59(10).
- Günel, M., Pinski, B., & AbuGhazaleh, A. A. (2017). Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. *Italian Journal of Animal Science*, 16(3), 500–506. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1291283>
- Hart, K. J., Yáñez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1–3), 8–35. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007>
- Hasunuma, T., Uyeno, Y., Akiyama, K., & Hashimura, S. (2016). Consecutive reticular pH monitoring in dairy cows fed diets supplemented with active dry yeast during the transition and mid-lactation periods. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 215–225. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.09.002>
- Holden, L. A. (1999). Comparison of Methods of In Vitro Dry Matter Digestibility for Ten Feeds. *Journal of Dairy Science*, 82(8), 1791–1794. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75409-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75409-3)
- Hossein Jahani-Azizabadi. (2011). Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using *in vitro* batch culture. *African Journal of Microbiology Research*, 5(27). <https://doi.org/10.5897/AJMR11.575>
- Hu, Q., & Zhou, M. (2018). Progress on the Antimicrobial Activity Research of Clove Oil and Eugenol in the Food Antisepsis. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14180>
- Jayasena, D. D., & Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 34(2), 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002>
- Kholif, A. E., Kassab, A. Y., Azzaz, H. H., Matloup, O. H., Hamdon, H. A., Olafadehan, O. A., & Morsy, T. A. (2018). Essential oils blend with a newly developed enzyme cocktail works synergistically to enhance feed utilization and milk production of Farafra ewes in the subtropics. *Small Ruminant Research*, 161. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.02.011>
- Khorshidian, N., Yousefi, M., Khanniri, E., & Mortazavian, A. M. (2018). Potential

- application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 45(August 2017), 62–72.
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.020>
- Klevenhusen, F., Muro-reyes, A., Khiaosa-ard, R., Metzler-zebeli, B. U., & Zebeli, Q. (2012). A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on in vitro ruminal fermentation & . *Animal Feed Science and Technology*, 176(1–4), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.008>
- Makkar, H. P. S. (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *FAO*, 55–88. Retrieved from <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/007/y5159e/y5159e02.pdf>
- Mandal, G. P., Roy, A., & Patra, A. K. (2016). Effects of plant extracts rich in tannins , saponins and essential oils on rumen fermentation and conjugated linoleic acid concentrations in vitro SAPONINS AND ESSENTIAL OILS ON RUMEN FERMENTATION AND CONJUGATED LINOLEIC ACID CONCENTRATIONS IN VITRO. *Indian Journal of Animal Health*, (July).
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Nabavi, S. F., Izadi, M., ... Ajami, M. (2017). Critical Reviews in Microbiology Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol : A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, 0(0), 000. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>
- Matilha, A., Filho, L. C., & Wolff, F. (2008). Simulação do processo de desterpenação supercrítica do óleo essencial de laranja. *Acta Scientiarum. Technology*, 23(May 2001), 1433–1437. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v23i0.2778>
- McCann, J. C., Elolimy, A. A., & Loor, J. J. (2017). Rumen Microbiome, Probiotics, and Fermentation Additives. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 33(3), 539–553. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2017.06.009>
- Medjekal, S., Bodas, R., Bousseboua, H., & López, S. (2017). Evaluation of three medicinal plants for methane production potential, fiber digestion and rumen fermentation in vitro. In *Energy Procedia* (Vol. 119). <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.089>
- Oliveira, R. C. de, & Igarasi, M. S. (2013). Utilização de óleos essenciais na mitigação da metanogênese. *Pubvet*, 7.

- Patra, A., Park, T., Kim, M., & Yu, Z. (2017). Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0145-9>
- Pirondini, M., Colombini, S., Malagutti, L., Rapetti, L., Galassi, G., Zanchi, R., & Crovetto, G. M. (2014). Effects of a selection of additives on in vitro ruminal methanogenesis and in situ and in vivo NDF digestibility, (March). <https://doi.org/10.1111/asj.12249>
- Plaizier, J. C., Danesh Mesgaran, M., Derakhshani, H., Golder, H., Khafipour, E., Kleen, J. L., ... Zebeli, Q. (2018). Review: Enhancing gastrointestinal health in dairy cows. *Animal*, (August), 1–20. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001921>
- Roy, D., Tomar, S. K., & Kumar, V. (2015). Rumen modulatory effect of thyme, clove and peppermint oils in vitro using buffalo rumen liquor. *Veterinary World*, 8(2), 203–207. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.203-207>
- Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M. C. T., & Godoy, H. T. (2009). Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 11(4), 442–449. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>
- Shabestari, A. H., Salamatdoustnobar, R., Maheri-Sis, N., Gorbani, A., Ahari, K. M., Noshadi, A., ... Nezhad, J. S. (2011). Evaluation effects of clove methanol extract on methane production in the in vitro condition. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12), 1154–1157. <https://doi.org/10.3923/pjn.2011.1154.1157>
- Tager, L. R., & Krause, K. M. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(5), 2455–2464. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3505>
- Tedeschi, L. O., Fonseca, M. A., Muir, J. P., Poppi, D. P., Carstens, G. E., Angerer, J. P., & Fox, D. G. (2017). A glimpse of the future in animal nutrition science. 2. Current and future solutions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(5). <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017000500012>
- Valenzuela-grijalva, N. V., Pinelli-saavedra, A., Muhlia-almazan, A., Domínguez-díaz, D., & González-ríos, H. (2017). Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40781-017-0133-9>

- Valero, M. V., Prado, R. M. do, Zawadzki, F., Eiras, C. E., Madrona, G. S., & Prado, I. N. do. (2014). Propolis and essential oils additives in the diets improved animal performance and feed efficiency of bulls finished in feedlot. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 36(4), 419. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v36i4.23856>
- Velho, J. P., Roberto, P., Mühlbach, F., Cristina, T., Genro, M., Otávio, J., ... Suñé, R. (2014). Mathematical models for adjustment of in vitro gas production at different incubation times and kinetics of corn silages Modelos matemáticos para ajuste da produção de gases in vitro em diferentes tempos de incubação e cinética ruminal de silagens de milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 2531–2540. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n4Sup11p2531>
- Yoshimura, E. H., Santos, N. W., Machado, E., Agostinho, B. C., Pereira, L. M., de Aguiar, S. C., ... Zeoula, L. M. (2018). Effects of dairy cow diets supplied with flaxseed oil and propolis extract, with or without vitamin E, on the ruminal microbiota, biohydrogenation, and digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 241, 163–172. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2018.04.024>
- Zeng, Z., Zhang, S., Wang, H., & Piao, X. (2015). Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition : a review. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0004-5>

1 **AVALIAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE LARANJA E CRAVO EM RAÇÕES DE**
2 **RUMINANTES UTILIZANDO SISTEMAS *IN VITRO***
3

4 **EXTRATOS DE PLANTAS COMO MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL**
5

6 **EVALUATION OF CLOVE AND ORANGE ESSENTIAL OILS IN RUMINANT**
7 **FEEDS USING *IN VITRO* SYSTEMS**
8

9 **ABSTRACT**

10 Essential Oils (OE) are natural additives that could be used in ruminant nutrition with the aim
11 of improving the efficiency of rumen fermentation. In this study, clove (OC) and orange (OL)
12 essential oils were tested on two different diets (80% - Beef and 50% concentrate - Dairy). The
13 methodologies used were the *in vitro* digestibility and gas production technique, as well as pH
14 and ammonia nitrogen (N-NH₃) measurements. The experimental design was completely
15 randomized with factorial (2X3) for each diet. The data obtained were compared by Tukey's
16 test and $\alpha = 0.05$ probability was adopted. When there was an effect of the level and the
17 essential oil or the interaction between the two, the results were analyzed by contrasts in the
18 SAS statistical program. The inclusion of OC maintained *in vitro* dry matter digestibility values
19 (IVDMD) in both diets, while OL reduced IVDMD only in the treatment with lower
20 concentrate content. The N-NH₃ contents were lower in relation to the control at the 400 mg /
21 L level of ruminal fluid buffered with the two OE, for the dairy diet. In relation to ruminal
22 kinetic parameters, the addition of OE increased the total volume of gas produced, with most
23 significant increase for OL in the Dairy diet. As for the partitioning factor (PF), it was reduced
24 in relation to the control in the milk diet, and was superior to the control in the cut diet for the
25 lower inclusion levels of OE (100 and 200 mg / L buffered ruminal fluid). The inclusion of
26 essential oils may improve the use of nitrogen in the rumen, without affecting ruminal
27 fermentation to the oils and inclusion levels investigated.

28 **KEYWORDS:** plants extracts, ruminal fermentation, feed additive, antimicrobial, ammonia

29
30 **INTRODUÇÃO**
31

32 A diversidade de microrganismos que habitam o ecossistema ruminal tornam os
33 ruminantes eficientes na conversão dos alimentos ingeridos em produtos metabolizáveis para
34 o organismo. Entretanto, nesse processo há algumas perdas consideráveis de energia, como a
35 produção de metano (CH₄). O uso de aditivos na dieta como ionóforos é utilizado para
36 modificar a fermentação ruminal e assim reduzir a produção de metano, perdas de nitrogênio e
37 melhorar a eficiência alimentar, contudo, o uso destes produtos está proibido na União
38 Europeia desde 2006. No Brasil, os consumidores também estão preocupados com questões
39 como a resistência bacteriana aos antibióticos e buscam uma alimentação orgânica e mais

40 saudável. Uma alternativa que despertou o interesse dos pesquisadores é a utilização de óleos
41 essenciais, estes são compostos secundários de plantas com diversos componentes ativos
42 (Calsamiglia et al., 2007a; Tedeschi et al., 2017). Os óleos essenciais possuem atividade
43 antimicrobiana de amplo espectro, sendo as bactérias gram-positivas mais susceptíveis.

44 Como aditivos modificadores da fermentação ruminal podem melhorar a eficiência
45 alimentar e reduzir a emissão de poluentes com resultados promissores (Cobellis, Trabalza-
46 Marinucci, & Yu, 2016). Contudo, dependendo do óleo e da quantidade utilizados, há efeitos
47 adversos na digestibilidade e fermentação ruminal (Klevenhusen et al., 2012). Outro efeito dos
48 óleos essenciais no rúmen também envolve redução da degradação da proteína (redução da
49 deaminação dos aminoácidos) e do amido, pela ação seletiva sobre alguns microrganismos
50 ruminais (Benchaar et al., 2008; Hart et al., 2008).

51 No Brasil, o óleo essencial produzido em maior escala é o óleo de laranja, pela grande
52 produção desta fruta para produção de sucos (Bizzo et al., 2009). O óleo essencial de laranja
53 extraído do pericarpo da fruta, com o limoneno sendo o principal componente ativo, tem grande
54 potencial para ser desenvolvido para utilização . O óleo essencial de cravo é um dos óleos
55 essenciais mais estudados para inclusão em dietas para ruminantes, tem como principal
56 componente o eugenol e possui atividade antimicrobiana, anestésica e antioxidante (Scherer et
57 al., 2009).

58 O uso de técnicas *in vitro* é amplamente utilizado para a avaliação de alimentos e
59 aditivos como óleos essenciais, apesar de suas limitações para correlacionar com resultados
60 obtidos *in vivo* (Mirko Cattani et al., 2016). Baseado na simulação do ambiente ruminal,
61 podemos avaliar o desaparecimento da matéria orgânica pela quantificação de resíduos após a
62 incubação e a cinética de fermentação ruminal, por meio de modelos matemáticos.

63 A inclusão de óleos essenciais na dieta de ruminantes pode ser benéfica para a
64 população de microrganismos ruminais e melhorar a eficiência alimentar de bovinos leiteiros
65 e de corte. Assim, objetivou-se avaliar a inclusão de óleos essenciais em simulações *in vitro*
66 sobre diversos parâmetros de fermentação ruminal, como o pH, digestibilidade da matéria seca
67 (DIVMS), digestibilidade da fibra em detergente neutro (DIVFDN), níveis de nitrogênio
68 amoniacal (N-NH₃), além dos parâmetros de cinética ruminal. Os óleos essenciais foram
69 avaliados simulando dietas para gado de leite e de corte, com diferentes proporções de
70 concentrado e volumoso.

71 MATERIAL E MÉTODOS

72

73 O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi, no Laboratório de
 74 Digestibilidade *in vitro* e Metabolismo Animal e no Laboratório de Análises de Alimentos e
 75 Nutrição Animal (LANA) no Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de
 76 Maringá. O experimento mesmo foi dividido em duas partes; na primeira se avaliaram os
 77 parâmetros de digestibilidade da matéria seca, fibra em detergente neutro, pH, nitrogênio
 78 amoniacal além dos parâmetros de cinética de fermentação ruminal em relação à adição de
 79 óleos essenciais para a dieta formulada para bovinos leiteiros. No segundo experimento, foram
 80 avaliados os mesmos parâmetros para a dieta formulada para bovinos de corte. O óleo essencial
 81 de laranja utilizado é extraído pela Quinari[®] e o óleo essencial e cravo pela Safeeds – Nutrição
 82 Animal[®].

83 A composição bromatológica (Tabela 1) dos alimentos utilizados no experimento foi
 84 avaliada após secagem do material em estufa e moagem em peneira de 1 mm. O material foi
 85 submetido a análises de MS, MM, PB e EE, segundo a metodologia da AOAC (2005) e FDN,
 86 segundo Mertens (2002). A MO foi calculada pela diferença entre a MS e MM. Os carboidratos
 87 totais foram calculados utilizando equação proposta por Sniffen et al., (1992): $100 - (PB + MM$
 88 $+ EE)$.

89

90 Tabela 1. Composição química dos ingredientes utilizados nas rações

Item	%						
	MS ¹	MM	MO	PB	EE	FDN	CT
Silagem de milho	37,05	1,57	35,48	6,95	2,65	49,58	88,83
Farelo de soja	89,11	5,54	83,57	46,26	1,32	9,05	46,88
Milho moído	88,76	1,1	87,66	7,56	4,22	9,81	87,12

91 ¹ MS= Matéria seca, MM = Matéria mineral, MO = Matéria orgânica, PB= proteína bruta, EE= extrato etéreo,
 92 FDN= fibra em detergente neutro, CT= Carboidratos totais.

93

94 *Experimento 1 – Dieta leite*

95

96 Foi formulada uma dieta experimental que se assemelha à dieta de animais utilizados
 97 para a produção de leite, baseado no NRC (2001), com 50% de concentrado e 50% volumoso
 98 (Tabela 2). Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com um fatorial (2X3) para
 99 cada tipo de óleos essenciais (cravo e laranja) em três níveis (0, 200 e 400 mg/L de fluido
 100 ruminal tamponado). O fluido ruminal tamponado compreende o líquido ruminal e a solução
 101 tampão de McDougall (1948).

102 Tabela 2. Composição da dieta experimental para bovinos leiteiros

Ingrediente (g/kg MS)	Dieta leite (50:50)
Silagem de milho	500
Farelo de soja	200
Milho moído	300
Composição bromatológica	
MS ¹ (g/kg MN)	629,75
MM (g/kg MS)	22,23
MO (g/kg MS)	607,52
PB (g/kg MS)	149,95
EE (g/kg MS)	28,55
FDN (g/kg MS)	295,43
CT (g/kg MS)	799,27

103 ¹ MS= Matéria seca, MM = Matéria mineral, MO = Matéria orgânica, PB= proteína bruta, EE= extrato etéreo,
 104 FDN= fibra em detergente neutro, CT= Carboidratos totais.

105

106 O experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de Tilley e Terry (1963),
 107 adaptada para degradabilidade *in vitro* em 24 horas (Calsamiglia et al., 2007b; Medjekal,
 108 Bodas, Bousseboua, & López, 2017). O método consiste na simulação da degradação ruminal
 109 utilizando tubos de digestibilidade contendo o substrato, líquido ruminal, solução tampão e gás
 110 carbônico (CO₂) mantidos a 39°C e em agitação constante em um banho metabólico.

111 O animal utilizado para a coleta de líquido animal foi uma vaca da raça Holandês, em
 112 período seco, alimentada com uma dieta contendo 60% de volumoso e 40% de concentrado,
 113 com um peso médio de 500 kg. O líquido ruminal foi coletado via cânula ruminal com auxílio
 114 de uma bomba de vácuo e um balão do tipo kitassato. Após a coleta, o líquido foi mantido em
 115 recipiente térmico com CO₂, para manutenção da temperatura e dos microrganismos ruminais
 116 até a incubação.

117 A solução tampão de McDougall (1948) foi preparada previamente. A solução é
 118 composta por duas partes: solução A, com 10 g/L de fosfato de potássio (KH₂PO₄), 0,5 g/L de
 119 sulfato de magnésio (MgSO₄7H₂), 0,5g/L de cloreto de sódio (NaCl), 0,1 g/L de cloreto de
 120 cálcio e 0,5 g/L de ureia. A solução B é composta de 15 g/L de carbonato de sódio (Na₂CO₃) e
 121 1 g/L de sulfito de sódio (Na₂S9H₂O). Os reagentes de cada solução tampão (A e B) foram
 122 diluídos em água destilada aquecida a 39°C separadamente. As soluções foram misturadas em
 123 uma proporção de 6:1 (Solução A: Solução B), até estabilizar o pH a 6,8, no momento da
 124 incubação.

125 Em cada tubo de digestibilidade foram adicionados o volumoso e o concentrado que
 126 foram pesados individualmente de acordo com as dietas (1 g de amostra) mais o OE de acordo
 127 com os tratamentos da Tabela 1, 30 mL de solução tampão, 15 mL de líquido ruminal e

128 expurgados com CO₂, para simular o ambiente anaeróbico ruminal. O óleo essencial foi
129 adicionado puro com auxílio de uma pipeta volumétrica, de acordo com os tratamentos
130 descritos anteriormente, sendo o peso correspondente a cada tratamento transformado em
131 volume de acordo com a densidade de cada óleo.

132 O pH foi mensurado nos tubos de digestibilidade antes da incubação, 12 e 24 horas após
133 com um potenciômetro digital marca TECNAL[®]. Os tubos de digestibilidade foram mantidos
134 em banho-maria a 39°C com agitação contínua por 24 horas. Depois da mensuração do pH de
135 24 horas, foi coletada parte do material sobrenadante e imediatamente congelada a -20°C para
136 posterior determinação do nitrogênio amoniacal. O conteúdo dos tubos foi filtrado em cadinhos
137 filtrantes número 1 com auxílio de uma bomba de vácuo e kitassato. O material restante foi
138 levado à estufa na temperatura de 105°C por 24 horas, e pesado após resfriar em dessecador.

139 O cálculo foi baseado na diferença entre a quantidade incubada e o resíduo pós-
140 incubação: $DIVMS = (MS \text{ (g) do alimento incubado} - MS \text{ (g) do resíduo}) / (MS \text{ (g) do alimento}$
141 $\text{incubado}) \times 100$. Após a pesagem do material restante, os mesmos cadinhos e amostras foram
142 usados para a determinação de degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro
143 (DIVFDN).

144 A DIVFDN foi determinada pelo método de Van Soest, Robertson e Lewis (1991),
145 calculada pela diferença do conteúdo dos cadinhos antes e depois da degradação (24 horas) e
146 secagem em estufa a 105°C. A amônia presente na amostra incubada foi determinada pelo
147 método da reação colorimétrica catalisada por indofenol do INCT, descrita por Detmann et. al,
148 (2012). As amostras de sobrenadante foram descongeladas à temperatura ambiente, preparadas
149 com solução de ácido tricloroacético (100 g/L) e posteriormente centrifugadas a 1.000 x g por
150 10 minutos, separando-se o sobrenadante. Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 15 µL
151 e, em seguida, foram adicionadas 1,5 mL da solução de fenol e 1,5 mL da solução de hipoclorito
152 de sódio e as amostras agitadas em vórtex. As amostras e as alíquotas para a curva padrão
153 foram mantidas em banho-maria a 39°C por 15 minutos e, posteriormente, com leitura em
154 espectrofotômetro com comprimento de onda de 630 nm. Os valores de absorbância obtidos
155 pelas amostras foram ajustados pela curva-padrão.

156 Os dados obtidos de cada parâmetro foram analisados utilizando o software estatístico
157 SAS, seguindo o modelo experimental:

158

159

$$160 \quad Y_{ij} = \mu + i + j + D_i + L_j + D_{ij} + e_{ij};$$

161

162 Em que:

163 μ = Média164 i = Efeito do óleo essencial165 j = Nível do óleo essencial166 D_i = Efeito do óleo essencial (óleo de cravo ou óleo de laranja)167 L_j = Efeito do nível (0, 200 ou 400 mg/L)168 D_{ij} = Efeito da interação óleo essencial X nível169 e_{ij} = erro

170

171 A cinética de fermentação ruminal foi avaliada com a mesma dieta experimental para
 172 bovinos leiteiros, em um fatorial (2X4), com dois tipos de óleo essencial (laranja e cravo), em
 173 quatro dosagens: 0, 100, 200 e 400 mg/L de fluido ruminal tamponado). A metodologia
 174 utilizada foi descrita por Theodorou et al. (1998) e Pell et al. (1998), modificada para um
 175 sistema computadorizado (ANKOM[®] RF- Gas production system, ANKOM[®], Macedon, NY,
 176 USA).

177 Para a incubação, 0,5 gramas de amostra das dietas experimentais foram pesadas e
 178 adicionadas a frascos de borosilicato em triplicata mais o branco para controle, com as
 179 dosagens de OE, 100 mL de saliva artificial, 25 mL de líquido ruminal e CO₂. Os frascos foram
 180 acoplados aos módulos do sistema, e mantidos em banho-maria com agitação por 48 horas a
 181 39°C. Os dados de pressão (em psi) foram coletados em intervalos de 10 minutos e
 182 armazenados automaticamente em uma planilha no computador. Depois do tempo de
 183 incubação, o conteúdo dos frascos foi filtrado com cadinhos filtrantes número 1 e bomba de
 184 vácuo, secados em estufa a 105°C por 24 horas e pesados para determinar a matéria fermentada
 185 no processo.

186 Os dados de pressão (em psi) foram transformados em moles de gases usando a lei do
 187 gás 'ideal', e então para mililitros (mL) de gases através da lei de Avogadro. Depois, os
 188 resultados foram expressos em mL de gases produzidos por grama de matéria orgânica
 189 degradada (mL g⁻¹ MO degradada).

190 A produção de gás em resposta a degradação das amostras foi analisada a partir do
 191 modelo Exponencial com Lag Time, proposto por Mertens (1993):

$$192 \quad V_t = b\{1 - e^{-[c \cdot (t-L)]}\}$$

193 Em que:

194 V_t = Volume total de gás no tempo T;

195 b = volume total de gás

196 c = taxa de produção de gás

197 t = tempo

198 $L = \text{Lag phase}$

199

200 O ajuste das curvas e as estimativas dos parâmetros foram realizados utilizando-se o
 201 processo iterativo do Gauss-Newton por meio do procedimento para modelos não lineares
 202 (PROC NLIN) do programa SAS (Statistical Analysis System, versão 9.4). Para avaliar o
 203 modelo não linear, foi utilizado o coeficiente de determinação (R^2). Este valor representa
 204 quanto o modelo é capaz de ajustar os dados de produção de gás ($y = \text{mL de gás/ g substrato}$
 205 incubado). Este valor é obtido a partir da soma de quadrado do erro (SCE) e a soma total dos
 206 quadrados (SCT) a partir da equação:

$$207 \quad r = 1,0 - \frac{\text{SCE}}{\text{SCT}}$$

208 O fator de partição (FP) foi calculado pela seguinte equação de acordo com (Makkar,
 209 2004) : $\text{FP} = \text{Mo}$ verdadeiramente degradada (mg)/volume total de gás (mL).

210 Os dados da DIVMS, DIVFDN, pH e N-NH₃, parâmetros de cinética ruminal e fator de
 211 partição, foram comparados com teste de médias (Tukey) e adotou-se $\alpha = 0,05$ de significância.
 212 Quando houve efeito do nível e do óleo essencial ou da interação entre os dois, os resultados
 213 foram desdobrados em contrastes, no programa estatístico SAS (versão 9.4).

214

215 *Experimento 2 – Dieta corte*

216

217 No segundo experimento, foi utilizada uma dieta experimental formulada de acordo
 218 com o NRC (2000) para alimentação de bovinos de corte (Tabela 3). O delineamento
 219 experimental foi o mesmo utilizado para o experimento 1, inteiramente casualizado com um
 220 fatorial (2X3) para cada tipo de óleos essenciais (cravo e laranja) em três níveis (0, 200 e 400
 221 mg/L de fluido ruminal tamponado).

222

223

224 Tabela 3. Composição da experimental para bovinos de corte

Ingrediente (g/kg MS)	Dieta Corte
Silagem de milho	200
Farelo de soja	100
Milho moído	700
Composição bromatológica	
MS ¹ (g/kg MN)	784,53
MM (g/kg MS)	16,38
MO (g/kg MS)	680,064
PB (g/kg MS)	113,08
EE (g/kg MS)	36,16
FDN (g/kg MS)	176,88
CT (g/kg MS)	834,38

225 ¹ MS= Matéria seca, MM = Matéria mineral, MO = Matéria orgânica, PB= proteína bruta, EE= extrato etéreo,
 226 FDN= fibra em detergente neutro, CT= Carboidratos totais.

227 Os procedimentos experimentais foram exatamente os mesmos utilizados no
 228 experimento 1, primeiramente degradabilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro
 229 *in vitro*, pH e nitrogênio amoniacal. Em seguida, foram avaliados os parâmetros de cinética
 230 ruminal e calculado o fator de partição, além das análises estatísticas (teste de Tukey e
 231 contrastes).

232

233 RESULTADOS E DISCUSSÃO

234

235 *Experimento 1 – Dieta Leite*

236

237 Na Tabela 4 estão representados os resultados de DIVMS e DIVFDN em 24 horas, pH
 238 12 e 24 horas e N-NH₃ para a dieta experimental que simula a dieta oferecida a vacas leiteiras.
 239 Essa dieta contém 50% de volumoso e 50% de concentrado, o que implica em melhores
 240 condições para fermentação ruminal e manutenção do pH ruminal, quando comparado com
 241 uma dieta com maior teor de concentrado, como para bovinos de corte em confinamento.

242 Houve interação entre óleo e nível ($p = 0,03$) sendo que a DIVMS foi reduzida com a
 243 adição de 400 mg/L de óleo essencial de laranja, possivelmente pelas características químicas
 244 do limoneno. No presente estudo não ocorreu redução significativa na DIVMS utilizando-se o
 245 óleo essencial de cravo, resultado também evidenciado por trabalho desenvolvido *in vitro* por
 246 Günal, Pinski, & AbuGhazaleh (2017), situação em que houve queda na produção de metano
 247 entérico, mantendo-se a fermentação ruminal.

248 Os valores de pH estão abaixo das recomendações adequadas para a manutenção da
249 saúde ruminal, pois não foram adicionados tamponantes para controlar a queda de pH durante
250 o período de incubação, e assim verificar o efeito da adição dos óleos essenciais sobre o mesmo.
251 O pH inicial (tempo 0 de incubação) foi 6,7. O pH após 24 horas de incubação foi alterado pela
252 inclusão do óleo essencial de laranja ($p = 0,02$) com valores médios de 5,43 contra 5,30 nos
253 tratamentos com adição de óleo de cravo e 5,38 no tratamento controle. A redução do pH se
254 deve ao acúmulo de ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta acumulados no líquido
255 ruminal. Essa redução pode exercer atividade seletiva sobre as bactérias ruminais,
256 especialmente as celulolíticas. Gunal, Ishlak, AbuGhazaleh, & Khattab (2014) utilizando dietas
257 com proporção volumoso: concentrado semelhantes à dieta leite do estudo, testando seis
258 diferentes óleos essenciais, entre eles o óleo essencial de cravo, não encontraram diferenças
259 para o pH mensurado em 24 horas de incubação.

260 Para o nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$), as maiores médias foram obtidas para o nível de
261 inclusão de 200 mg/L de fluido ruminal tamponado e controle, independentemente do óleo
262 utilizado. As menores médias foram para os tratamentos com maior inclusão de óleo essencial,
263 tanto para o óleo de cravo como de laranja. Concentrações mais baixas de $N-NH_3$ podem ser
264 relacionadas à melhor utilização da amônia pela microbiota ruminal (Baraka & Abdl-Rahman,
265 2012). A redução do $N-NH_3$ é possível pela atividade antimicrobiana do OE contra bactérias
266 hiperprodutoras de amônia, como descrito por estudos anteriores (Cobellis, Trabalza-
267 Marinucci, Marcotullio, & Yu, 2016). Não houve diferenças significativas para
268 degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN).

269 Os parâmetros da cinética de fermentação ruminal, calculados através do modelo
270 Exponencial com *Lag* e o fator de partição (FP) estão apresentados na Tabela 5. Este modelo
271 foi escolhido para análise a fim de comparar de maneira simplificada, considerando-se o *Lag*
272 *Time*. O *Lag Time* é representado pela letra L e indica o tempo que os microrganismos levaram
273 para colonizar o substrato dentro dos frascos experimentais. O parâmetro B representa o
274 volume total de gás produzido durante o período total de incubação (48 horas) e parâmetro C,
275 a taxa/hora que volume de gás representado for B foi produzido. O modelo Exponencial foi
276 ajustado a um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,99 para todos os parâmetros.

277 Não houve diferenças significativas para os parâmetros de cinética ruminal e para o
278 fator de partição em todos os tratamentos. Günal et al., (2017), analisando o efeito do óleo de
279 cravo e outros óleos essenciais, encontraram resultados divergentes, com redução da produção
280 de gás em inclusões de 250 e 500 mg/L de fluido ruminal fermentado.

281 Tabela 4. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca 24 horas (DIVMS), da fibra em detergente neutro 24 horas (FDN), potencial hidrogeniônico
 282 em 12 e 24 horas (pH) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) da dieta leite com diferentes tipos e níveis de OE.
 283

Nível	Controle		Óleo de Cravo		Óleo de Laranja		Óleo	Nível	Interação	Controle vs. outros	OC vs. OL	Controle vs. 200	200 vs. 400
	0	200	400	200	400								
DIVMS ¹	51,17±2,20 ^a	51,67±0,92 ^a	51,54±1,79 ^a	50,19±1,62 ^a	47,39±2,13 ^b	<.0001***	0,0199*	0,0322*	ns	<.0001***	ns	0,0262*	
DIVFDN	49,76±4,85	50,2±7,00	49,06±4,72	46,35±0,30	52,66±6,09	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
pH 12 h	5,59±0,06	5,64±0,05	5,66±0,03	5,60±0,02	5,66±0,01	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
pH 24 h	5,38±0,18	5,27±0,13	5,34±0,15	5,41±0,16	5,44±0,13	0,0179*	ns	ns	ns	0,0217*	ns	ns	
N-NH ₃	15,51±1,50 ^{ab}	19,16±3,64 ^a	14,60±1,83 ^b	16,03±0,86 ^{ab}	13,96±1,05 ^b	ns	0,0066**	ns	ns	ns	ns	0,0023**	

284 ¹DIVMS = Degradabilidade *in vitro* da matéria seca em 24 horas; Degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro em 24 horas; N-NH₃ = Nitrogênio Amoniacal; ²mg/L
 285 de fluido ruminal tamponado; ³Óleo essencial de cravo; ⁴Óleo essencial de laranja; ^{abc}letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<
 286 0,05); *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ns (P>0,05).
 287
 288

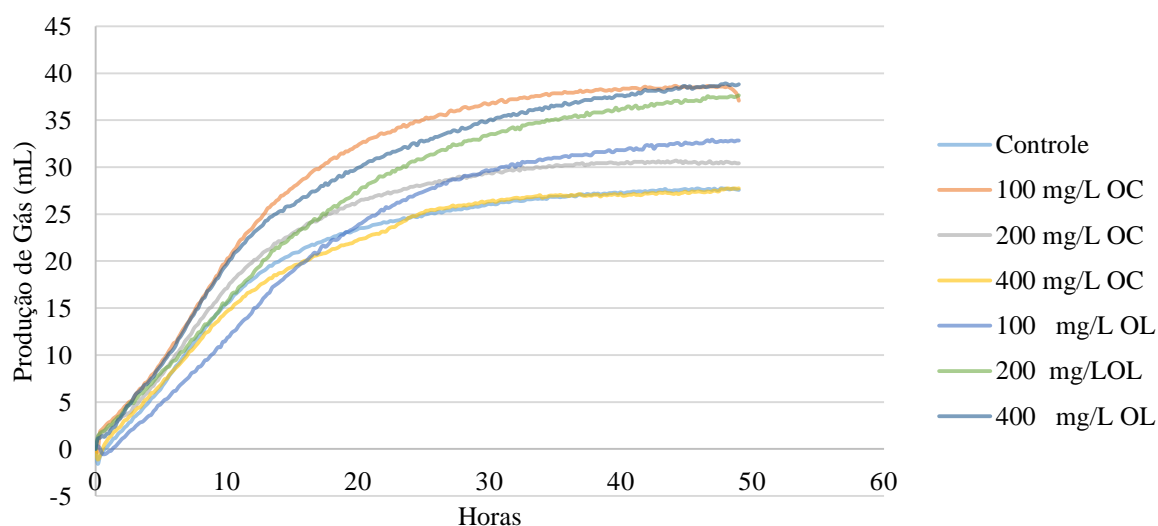
289 Tabela 5. Parâmetros cinéticos de fermentação ruminal (B = volume total de gás, C = taxa de produção de gás, L = lag phase, FP = Fator de
 290 Partição) para a dieta leite com diferentes tipos e níveis de OE.
 291

Nível	Controle		Óleo de cravo		Óleo de laranja			Óleo	Nível	Interação	Controle vs. outros	OC vs. OL	Controle vs. 100	100 vs. 200	200 vs. 400
	0	100	200	400	100	200	400								
B	28,49±3,32	37,73±2,11	31,71±2,01	29,22±2,93	36,57±8,10	38,75±6,76	38,13±5,70	0,0485*	ns	ns	0,0082**	0,0246*	0,0065**	ns	ns
C	0,09±0,02	0,07±0,02	0,08±0,00	0,08±0,03	0,05±0,00	0,05±0,00	0,06±0,01	0,0261*	ns	ns	0,0468*	0,0243*	0,0426*	ns	ns
L	1,23±1,03	1,3±0,46	0,85±0,61	1,12±1,07	1,83±0,38	0,47±1,27	0,82±0,37	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
FP	7,7±1,00	5,07±1,04	7,06±0,71	6,3±1,04	5,44±2,74	4,89±1,93	4,88±1,03	ns	ns	ns	0,0083**	ns	0,0106*	ns	ns

292 ¹ mg/L de fluido ruminal tamponado; ²Óleo essencial de laranja; ³Óleo essencial de cravo; B = volume total de gás; C = taxa de produção de gás; L = Lag phase; FB = fator de
 293 partição; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ns (P>0,05).
 294

295 A técnica de produção de gases mensura os gases produzidos como resultado da
 296 degradação na maior parte de carboidratos (Buono, Vitti, Louvandini, & Abdalla, 2008;
 297 Medjekal et al., 2017), sendo possível observar a diferença na velocidade de degradação e
 298 produção de gases entre as duas dietas e entre os tratamentos. A contribuição dos gases
 299 resultantes da degradação da proteína é muito baixa, não sendo evidenciada nas curvas de
 300 produção cumulativa de gases. A produção acumulada de gás (mL de gás/ 100 mg de MS
 301 incubada), registrada durante 48 horas a cada 10 minutos em sistema computadorizado para a
 302 dieta leite, está representada na Figura 1.

303 Figura 1. Curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás/ 100 mg de MS incubada da
 304 dieta leite com diferentes tipos e níveis de OE



305 OC = Óleo essencial de cravo; OL = Óleo essencial de laranja; mg/L de fluido ruminal tamponado.
 306
 307

308 309 *Experimento 2 – Dieta corte*

311 No segundo experimento, diferentemente do primeiro, foi utilizada uma dieta
 312 experimental formulada para bovinos de corte, com maior quantidade de concentrado (80%)
 313 em relação ao volumoso (20%). Essa composição teoricamente faz com que a degradação dos
 314 alimentos do rúmen ocorra de forma mais rápida, maior queda de pH ruminal e menor volume
 315 total de gás produzido.

316 Na Tabela 6 estão representados os parâmetros de degradabilidade ruminal e pH. Não
 317 houve diferenças significativas entre os tratamentos para DIVMS e DIVFDN, possivelmente
 318 pela composição da dieta experimental, não havendo nenhum efeito negativo ou positivo sobre
 319 estes parâmetros com a inclusão de óleos essenciais.

320 O pH inicial para a incubação para DIVMS, DIVFDN e N-NH₃, foi em média 6,8.
321 Quando analisado o pH, 12 horas após o início do experimento, o menor valor foi encontrado
322 com a inclusão de 200 mg/L de óleo essencial de laranja, e os demais tratamentos todos com
323 valores médios superiores em relação ao controle, havendo interação entre óleo e nível ($p =$
324 $0,007$). Neste caso, os óleos podem ser benéficos para controlar o pH ruminal em dietas com
325 alto concentrado, mas com ressalvas considerando-se que foi analisado o pH somente em dois
326 horários. Não houve diferença significativa para o pH em 24 horas, possivelmente pela
327 composição da dieta para bovinos de corte, com maior teor de alimentos com carboidratos
328 rapidamente fermentáveis (Calsamiglia et al., 2007a), com a degradação completada até 24
329 horas.

330 Para o N-NH₃, as menores médias foram encontradas para os tratamentos com adição
331 de 200 mg/L, independentemente do óleo essencial, havendo interação entre níveis ($p = 0,001$).
332 Considerando-se este parâmetro, menores valores indicam menor quantidade de nitrogênio no
333 rúmen e maior quantidade utilizada pelas bactérias e pelo organismo animal. Isto indica que os
334 óleos essenciais podem ter aumentado a síntese de proteína microbiana no rúmen, com a
335 utilização de amônia como substrato, diminuindo a excreção de nitrogênio (Valenzuela-
336 grijalva et al., 2017).

337 Quando analisados os parâmetros de fermentação ruminal para as incubações com a
338 dieta para corte, não foram encontrados efeitos significativos para os parâmetros B, C e L. Para
339 o fator de partição, houve diferença significativa para óleo ($p = 0,04$) e nível ($p = 0,01$). Nos
340 contrastes, há uma diferença significativa entre o óleo de cravo e de laranja ($p < 0,05$) e entre os
341 níveis 100 vs. 200 ($p = 0,04$) e 200 vs. 400 ($p = 0,003$) mg/L fluido ruminal tamponado.

342 A inclusão de óleo de cravo nos níveis de 100 e 200 mg/L e de óleo de laranja em 200
343 mg/L de fluido ruminal tamponado aumentou o fator de partição (FP) e, conseqüentemente,
344 melhorando a eficiência fermentativa sem modificar o volume de gás produzido. Maior fator
345 de partição indica maior quantidade de matéria orgânica que foi incorporada à massa
346 microbiana, indicando também maior eficiência de síntese microbiana e menores perdas por
347 gases (Velho et al., 2014).

348
349
350
351
352
353
354

355 Tabela 6. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca 24 horas (DIVMS), da fibra em detergente neutro 24 horas (FDN), potencial hidrogeniônico
 356 em 12 e 24 horas (pH) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) da dieta corte com diferentes tipos e níveis de OE

Nível	Controle		Óleo de cravo		Óleo de laranja		Óleo	Nível	Interação	Controle vs. outros	OC vs. OL	Controle vs. 200	200 vs. 400
	0	200	400	200	400								
DIVMS ¹	51,16±2,20	51,67±0,92	51,54±1,79	50,19±1,62	49,13±2,13	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DIVFDN	41,78±6,09	48,81±4,58	49,22±4,94	54,50±7,02	48,90±4,43	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
pH 12 h	5,57±0,09 ^{ab}	5,64±0,06 ^a	5,60±0,02 ^{ab}	5,50±0,00 ^b	5,63±0,03 ^{ab}	ns	ns	0,0072**	ns	ns	ns	ns	ns
pH 24 h	5,32±0,19	5,43±0,34	5,40±0,25	5,29±0,16	5,29±0,04	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
N-NH ₃	14,05±1,20 ^a	10,26±0,18 ^b	13,67±1,40 ^a	10,84±1,01 ^b	12,54±0,71 ^{ab}	ns	0,0016**	ns	0,0025**	ns	0,0001***	0,0007***	

357 ¹DIVMS = Degradabilidade *in vitro* da matéria seca em 24 horas; Degradabilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro em 24 horas; N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal; ²mg/L
 358 de fluido ruminal tamponado; ³Óleo essencial de cravo; ⁴Óleo essencial de laranja; ^{ab}letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey (P<
 359 0,05); *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ns (P>0,05).
 360

361 Tabela 7. Parâmetros cinéticos de fermentação ruminal (B = volume total de gás, C = taxa de produção de gás, L = *lag phase*, FP = Fator de
 362 Partição) para a dieta corte com diferentes tipos e níveis de OE.

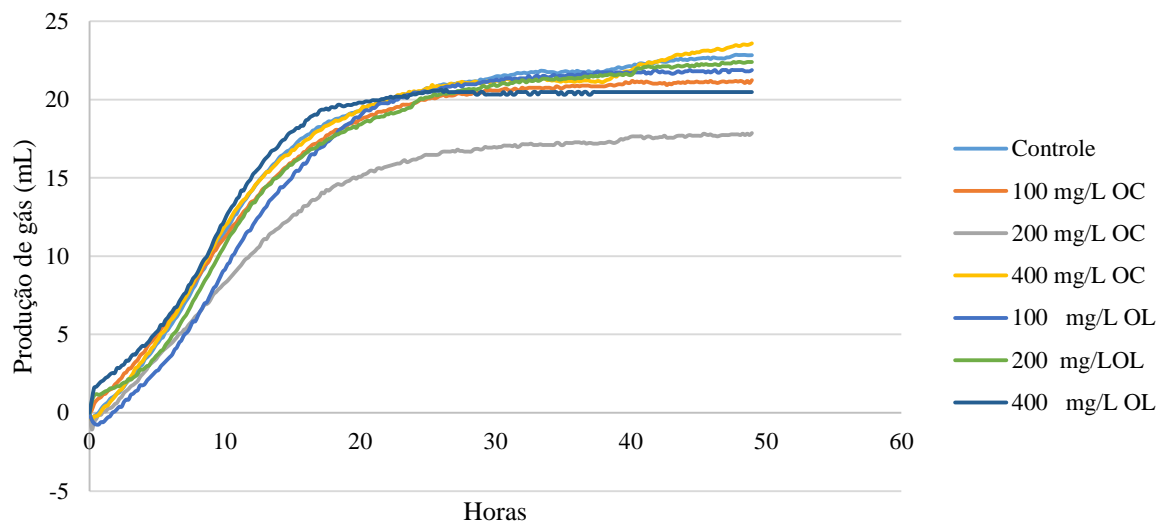
Nível	Controle		Óleo de cravo		Óleo de laranja			Óleo	Nível	Interação	Controle vs. outros	OC vs. OL	Controle vs. 100	100 vs. 200	200 vs. 400
	0	100	200	400	100	200	400								
B	23,45±2,15	22,07±3,21	18,67±0,42	25,67±4,41	25,71±3,84	23,55±4,36	27,20±10,06	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
C	0,08±0,01	0,07±0,00	0,07±0,00	0,09±0,00	0,08±0,00	0,07±0,01	0,09±0,02	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,0451*
L	1,45±1,14	1,24±0,44	1,68±0,52	1,47±1,34	2,04±0,45	1,45±0,48	1,30±0,55	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
FP	13,72±1,14 ^b	16,79±3,93 ^{ab}	20,36±0,19 ^a	11,51±1,32 ^b	12,29±2,19 ^b	15,24±3,06 ^{ab}	11,66±4,87 ^b	0,044*	0,0129*	ns	ns	0,0149*	ns	0,0415*	0,003**

363

364 ¹ mg/L de fluido ruminal tamponado; ²Óleo essencial de laranja; ³Óleo essencial de cravo; B = volume total de gás; C = taxa de produção de gás; L = *Lag phase*; FB = fator de
 365 partição; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ns (P>0,05).

366 Na Figura 2, estão representadas as curvas de produção cumulativa de gases para a dieta
 367 experimental de bovinos de corte, de acordo com as dosagens de óleos essenciais, obtidas por
 368 meio da técnica de produção de gases *in vitro*.

369 Figura 2. Curvas de produção cumulativa de gás em mL de gás/100 mg de MS incubada da
 370 dieta corte com diferentes tipos e níveis de OE



371

372 OC = Óleo essencial de cravo; OL = Óleo essencial de laranja; mg/L de fluido ruminal tamponado.

373

374 Apesar de alguns resultados interessantes para a adição de óleos essenciais na dieta de
 375 bovinos leiteiros e de corte, algumas ressalvas precisam ser consideradas. A avaliação completa
 376 destes compostos após estudos mais criteriosos *in vitro* e *in vivo* para desempenho, além de
 377 verificar a presença de possíveis resíduos e cheiros em produtos de origem animal, é importante
 378 para atestar a eficácia e segurança destes compostos. Outra possibilidade é a utilização de
 379 misturas de óleos essenciais ou com outros produtos, como algumas empresas já têm oferecido
 380 no mercado como aditivos moduladores de fermentação ruminal e melhoria da eficiência
 381 alimentar.

382

383 CONCLUSÕES

384

385 A inclusão de 100 a 200 mg/L de óleo essencial de laranja e de cravo pode ser benéfica
 386 para a melhoria da eficiência de fermentação ruminal em dietas com maior ou menor teor de
 387 concentrado. Os óleos essenciais de laranja e cravo também demonstraram efeitos positivos
 388 sobre os teores de nitrogênio amoniacal, indicador de síntese proteica e microbiana, sem afetar
 389 negativamente parâmetros de cinética de fermentação ruminal.

390 AGRADECIMENTOS

391

392 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
393 Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes) - código de financiamento 001 e do CNPq Projeto
394 Universal 2016, Proc. No. 405.689/2016-0.

395

396 REFERÊNCIAS

397

398 Association Official Analytical Chemist [AOAC]. (2006). *Official Methods of Analysis* (15th
399 ed.). Arlington, VA: AOAC International.

400 Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A. V., Fraser, G. R., Colombatto, D., McAllister, T. A.,
401 & Beauchemin, K. A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant
402 nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 209-228. DOI:
403 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>

404 Baraka, T. A. M., & Abdl-Rahman, M. A. (2012). In vitro Evaluation of Sheep Rumen
405 Fermentation Pattern After Adding Different Levels of Eugenol - Fumaric acid
406 Combinations. *Veterinary World*, 5(2), 110. DOI:10.5455/vetworld.2012.110-117

407 Bizzo, H. R., Hovell, A. M. C., & Rezende, C. M. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos
408 gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 32(3), 588-594. DOI:
409 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300005>.

410 Bueno, I. C. S., Vitti, D. M. S. S., Louvandini, H., & Abdalla, A. L. (2008). A new approach
411 for in vitro bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production
412 technique. *Animal Feed Science and Technology*, 141(2), 153–170. DOI:
413 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.011>

414 Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited
415 review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy
416 science*, 90(6), 2580-2595. DOI: 10.3168/jds.2006-644.

417 Cattani, M., Maccarana, L., Rossi, G., Tagliapietra, F., Schiavon, S., & Bailoni, L. (2016).
418 Dose-response and inclusion effects of pure natural extracts and synthetic compounds on
419 in vitro methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 218, 100-109. DOI:
420 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.05.014>.

- 421 Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., Marcotullio, M. C., & Yu, Z. (2016). Evaluation of
422 different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen
423 fermentation, and rumen bacteria in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 215,
424 25–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.008>
- 425 Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., & Yu, Z. (2016). Critical evaluation of essential oils as
426 rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Science of the Total Environment*, 545,
427 556-568. DOI: DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.12.103.
- 428 Detmann, E., Souza, M. D., Valadares Filho, S. C., Queiroz, A. D., Berchielli, T. T., Saliba, E.
429 O. S., ... & Azevedo, J. A. G. (2012). Métodos para análise de alimentos-Instituto
430 Nacional de Ciência e Tecnologia em Ciência Animal. Visconde do Rio Branco.
431 Suprema: Brasil.
- 432 Gunal, M., Ishlak, A., AbuGhazaleh, A. A., & Khattab, W. (2014). Essential oils effect on
433 rumen fermentation and biohydrogenation under in vitro conditions. *Czech J Anim*
434 *Sci*, 59(10), 450-459.
- 435 Günal, M., Pinski, B., & AbuGhazaleh, A. A. (2017). Evaluating the effects of essential oils
436 on methane production and fermentation under in vitro conditions. *Italian Journal of*
437 *Animal Science*, 16(3), 500-506. DOI: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1291283>
- 438 Hart, K. J., Yanez-Ruiz, D. R., Duval, S. M., McEwan, N. R., & Newbold, C. J. (2008). Plant
439 extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and*
440 *Technology*, 147(1-3), 8-35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007>
- 441 Klevenhusen, F., Muro-Reyes, A., Khiaosa-ard, R., Metzler-Zebeli, B. U., & Zebeli, Q. (2012).
442 A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive
443 compounds on in vitro ruminal fermentation. *Animal feed science and technology*, 176(1-
444 4), 61-69. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.008>
- 445 Makkar, H. P. S. (2004). Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of
446 nutritional quality of feed resources. FAO, 55–88. Retrieved from
447 <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/007/y5159e/y5159e02.pdf>
- 448 Medjekal, S., Bodas, R., Bousseboua, H., & López, S. (2017). Evaluation of three medicinal
449 plants for methane production potential, fiber digestion and rumen fermentation in vitro.
450 *Energy Procedia*, 119, 632-641. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.07.089>
451

- 452 Mertens, D. R. (1993). Rate and extent of digestion. In ed. CAB International (Eds.).
453 *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism* (13-50). Wallingford, UK:
454 J. M. Forbes and J. France. DOI: DOI: 10.1079/9780851998145.0049
- 455 National Research Council (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. (7th ed rev.)
456 Washington, DC: National Academy Press.
- 457 National Research Council. (2000). *Nutrient requirements of beef cattle*. (7th ed. rev.)
458 Washington, DC: National Academy Press.
- 459 Pell, A. N., Pitt, R. E., Doane, P. H., & Schofield, P. (1998). The development, use and
460 application of the gas production technique at Cornell University, USA. *BSAP*
461 *Occasional Publication*, 22, 45-54. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0263967X00032262>
- 462 Scherer, R., Wagner, R., Duarte, M. C. T., & Godoy, H. T. (2009). Composição e atividades
463 antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e
464 palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. DOI:
465 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722009000400013>.
- 466 Sniffen, C. J., O'connor, J. D., Van Soest, P. J., Fox, D. G., & Russell, J. B. (1992). A net
467 carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein
468 availability. *Journal of animal science*, 70(11), 3562-3577.
- 469 Tedeschi, L. O., Fonseca, M. A., Muir, J. P., Poppi, D. P., Carstens, G. E., Angerer, J. P., &
470 Fox, D. G. (2017). A glimpse of the future in animal nutrition science. 2. Current and
471 future solutions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46(5), 452-469. DOI:
472 <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-92902017000500012>
- 473 Theodorou, M., Lowman, R., Davies, Z., Cuddeford, D., & Owen, E. (1998). Principles of
474 techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. *BSAP Occasional*
475 *Publication*, 22, 55-63. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0263967X00032274>.
- 476 Tilley, J. M. A., & Terry, R. A. (1963). A two-stage technique for the in vitro digestion of
477 forage crops. *Grass and forage science*, 18(2), 104-111. DOI:
478 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x>
- 479 Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D.,
480 & González-Ríos, H. (2017). Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth

- 481 promoters in animal production. *Journal of animal science and technology*, 59(1), 8.
482 DOI: 10.1186/s40781-017-0133-9
- 483 Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral
484 detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of*
485 *dairy science*, 74(10), 3583-3597. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2
- 486 Velho, J. P., Frenzel Mühlbach, P. R., Moraes Genro, T. C., Jardim Barcellos, J. O., Braccini
487 Neto, J., & Suñé Martins da Silva, R. (2014). Modelos matemáticos para ajuste da
488 produção de gases in vitro em diferentes tempos de incubação e cinética ruminal de
489 silagens de milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4). DOI: 10.5433/1679-
490 0359.2014v35n4Suplp2531