

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**COMPOSTOS DE PLANTAS COMO MODULADORES DA FERMENTAÇÃO  
RUMINAL EM OVINOS RECEBENDO DIETA COM ALTO TEOR DE  
CONCENTRADO**

LAION ANTUNES STELLA  
Zootecnista/UFSM  
Mestre em Zootecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em  
Zootecnia  
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março, 2017

## CIP - Catalogação na Publicação

Stella, Laion Antunes  
COMPOSTOS DE PLANTAS COMO MODULADORES DA  
FERMENTAÇÃO RUMINAL EM OVINOS RECEBENDO DIETA COM  
ALTO TEOR DE CONCENTRADO / Laion Antunes Stella. --  
2017.  
117 f.

Orientador: Júlio Otávio Jardim Barcellos.  
Coorientador: Ênio Rosa Prates.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. produção animal. 2. nutrição de ruminantes. 3.  
engorde de ovinos. 4. aditivos. 5. compostos de  
plantas. I. Barcellos, Júlio Otávio Jardim, orient.  
II. Prates, Ênio Rosa, coorient. III. Título.

LAION ANTUNES STELLA  
Zootecnista e Mestre em Zootecnia

**TESE**

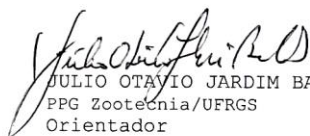
Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

**DOUTOR EM ZOOTECNIA**

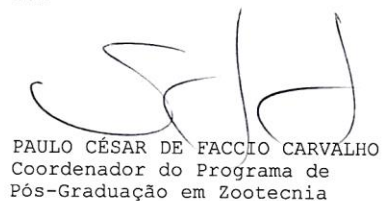
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 21.03.2017  
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 17.05.2017  
Por



JULIO OTAVIO JARDIM BARCELLOS  
PPG Zootecnia/UFRGS  
Orientador



PAULO CÉSAR DE FACCIO CARVALHO  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia



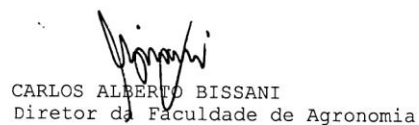
ALEXANDRE BERNDT  
EMBRAPA



ELISA CRISRINA MODESTO  
Dep. de Zootecnia/UFRGS



VANESSA PERIPOLLI  
IFC



CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de Agronomia

Autor: Laion Antunes Stella  
Orientador: Júlio Otávio Jardim Barcellos  
Co-Orientador: Ênio Rosa Prates

**Resumo-** O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes compostos de plantas com capacidade antimicrobiana comprovada, como aditivos moduladores da fermentação ruminal e suas eventuais consequências, para ovinos recebendo dieta com alto teor de concentrado. Foram realizados dois experimentos, tendo como objetivo no primeiro experimento avaliar compostos secundários de plantas presentes em óleos essenciais em substituição a monensina sódica como modificadores da fermentação ruminal *in vitro*. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 4 repetições, sendo os tratamentos utilizados: controle, monensina sódica (MON), óleo de alho (ALH), óleo de canela (CAN), óleo de cravo (CRA), óleo de hortelã-pimenta (HOR), óleo de junipero (JUN), óleo de laranja amarga (LAR), e óleo de melaleuca (MEL). Utilizou-se a técnica *in vitro* de produção de gás, onde as coletas foram realizadas nos horários 4, 8, 12 e 24 horas após a incubação. A produção de gás foi alterada ( $P < 0,001$ ) para os tratamentos MON, CAN e CRA. Os tratamentos ALH e CAN foram capazes de reduzir a digestibilidade da matéria orgânica em 20 e 26% em relação ao tratamento controle. A redução da produção de metano em relação ao tratamento controle foi de: 54%, 76%, 90%, 72%, 32%, 60%, 44% e 47%; respectivamente para MON, ALH, CAN, CRA, HOR, JUN, LAR, MEL ( $P < 0,001$ ). A concentração de  $N-NH_3$  foi reduzida drasticamente ( $P < 0,001$ ) em todos os tratamentos em relação ao tratamento controle e os óleos de CRA e HOR aumentaram o pH. No experimento 2 objetivou-se avaliar o uso de extratos de plantas como moduladores da fermentação ruminal e suas alterações na resposta produtivas para cordeiros confinados recebendo dieta com alto teor de concentrado. Foi adotado um delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições, sendo os tratamentos: Controle (CON), Óleo de cártamo (CAR), Óleo de borragem (BOR) e Óleo de gergelim (GER). Foram usados 16 ovinos machos Ile de France, castrados, com cinco meses de idade e peso vivo médio inicial de  $21,68 \pm 2,00$  kg. Cada animal recebeu 1 ml/dia de óleo. Os parâmetros de ganho médio diário (GMD) não foram alterados, tendo como média para os tratamentos que ganhavam óleo 198g/dia ( $P = 0,96$ ). Houve influência no consumo de nutrientes ( $P = 0,03$ ), sendo que o tratamento BOR apresentou maior consumo de matéria seca, proteína, fibra e energia em relação ao tratamento CON. A produção de metano/animal/dia em gramas foi reduzida ( $P = 0,01$ ) em 23% em relação ao tratamento CON no tratamento GER, e com uma tendência de redução nos outros tratamentos que receberam óleo, principalmente no tratamento CAR. Ocorreram diferenças significativas no comportamento ingestivo para os períodos, nos parâmetros de alimentação, tempo de mastigação total e ócio ( $P < 0,001$ ). Os óleos essenciais testados *in vitro* no experimento 1, excluindo o ALH e CAN, na dosagem de 1ml/l de solução foram eficientes na redução do metano e da amônia sem alterar a digestibilidade da matéria orgânica. O BOR adicionado a uma dieta de alto concentrado para ovinos aumentou o consumo de matéria seca em 5%. O GER reduziu em 23% a produção diária de metano, sem afetar o desempenho, a digestibilidade, os parâmetros fermentativos e o comportamento dos animais.

---

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (117p.) Março, 2017.

Author: Laion Antunes Stella  
Adviser: Júlio Otávio Jardim Barcellos  
Co-Adviser: Ênio Rosa Prates

**Abstract-** The objective of this study was to evaluate the potential of plant compounds with proven antimicrobial properties to modify the *in vitro* and *in vivo* ruminal fermentation, and their implications on sheep fed high concentrate diets. One experiment was conducted to evaluate the effect of secondary plant compounds present in essential oils in replacement of monensin on *in vitro* ruminal fermentation parameters. It was adopted a completely randomized design with nine treatments and four replicates. The treatments were: control (CON), monensin (MON), garlic oil (ALH), cinnamon oil (CAN), clove oil (CRA), mint oil (HOR), juniper oil (JUN), bitter orange oil (LAR), and melaleuca oil (MEL). The *in vitro* gas technique was used to record total gas production at 4, 8, 12 and 24 h after incubation. MON, CAN and CRA increased gas production. Garlic and cinnamon were able to reduce the digestibility of organic matter in 20 and 26% in relation to the control treatment. Methane production reduced ( $P < 0.001$ ) in 54, 76, 90, 72, 32, 60, 44 and 47% for MON, ALH, CAN, CRA, HOR, JUN, LAR and MEL, respectively. The N-NH<sub>3</sub> concentration was dramatically reduced ( $P < 0.001$ ) with all additives and CRA and HOR increased the pH. In the experiment 2, the objective was to evaluate the effect of plants extracts on ruminal fermentation, performance and behavior of growing lamb fed high concentrate diets. It was adopted a completely randomized design with four treatments and three replicates. Treatments were: Control (CON), Sunflower oil (CAR), Borage oil (BOR) and Sesame oil (GER). Sixteen male Ile de France sheep, castrated, with five months of age and average initial live weight of 21.68  $\pm$  2.00 kg were used. Each animal received 1 ml d<sup>-1</sup> of oil. The average daily gain (ADG) was of 198 g d<sup>-1</sup> with no differences between treatments ( $P < 0.96$ ). Nutrient intake was significantly affected ( $P = 0.03$ ). BOR animals had higher DM, protein, fiber and energy intake in relation to the CON and GER reduced methane production (g animal d<sup>-1</sup>;  $P = 0.01$ ) by 23% in relation to the NR. Emissions in other additives showed a tendency of reduction, especially CAR. Total chewing time and leisure time differed between periods ( $P < 0.001$ ). The essential oils tested *in vitro* in experiment 1, excluding ALH and CAN, at the dosage of 1 ml / l solution were efficient in the reduction of methane and ammonia without altering the digestibility of the organic matter. BOR added to a high concentrate diet for sheep was able to increase dry matter intake by 5%. GER was able to reduce daily production of methane by 23%, without altering the performance, digestibility, fermentative parameters of the animals and animal behavior.

---

<sup>1</sup>Doctoral Thesis in Animal Science – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (117p.), March, 2017.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha família, especialmente aos meus pais Elenir e Marco e meu irmão Caio, meus maiores apoiadores e motivadores. A minha namorada Bruna por fazer os meus dias mais felizes.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela possibilidade de realização do curso de Doutorado em Zootecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelas bolsas de doutorado e ao Conselho Nacional de desenvolvimento científico e tecnológico – CNPq pelo financiamento dos experimentos dessa tese.

Ao Professor Ênio Rosa Prates pela orientação, dedicação, e por compartilhar um pouco de sua experiência.

Ao Professor Júlio Barcellos e ao grupo NESPRO pelos anos de convívio e aprendizado.

Ao Angel e o Caio pela disposição e auxílio na execução dos experimentos dessa tese.

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS.

A Vanessa Peripolli por sempre estar disposta a ajudar nos desafios da pós-graduação.

Aos pesquisadores Alexandre Berndt e Cristina Genro e aos Professores Cimélio Bayer e Paulo Carvalho pelo apoio nas avaliações de metano.

Aos Professores João Pedro Velho e Ana Gabriela Saccol pelas considerações na qualificação.

A secretária Ione por sua dedicação ao programa.

Ao Grupo Frota da UFRGS pelas logísticas.

A Mônica e Aline e ao Laboratório de Nutrição Animal.

A Professora Stella Valle e ao Laboratório de análises clínicas veterinárias pelas análises sanguíneas.

A empresa Nutrifarma pelo sal mineral e a empresa Lazslo pelo apoio na aquisição dos óleos.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO I .....	12
Introdução geral .....	13
Hipótese .....	15
Objetivos gerais.....	15
Objetivos específicos .....	15
Revisão bibliográfica .....	16
1-Sistemas intensivos sustentáveis de produção de ruminantes .....	16
1.1- Nível de inclusão de grãos na dieta .....	17
1.2- Tipo e processamento do grão.....	17
1.3- Emissões de gases associadas ao uso de grãos na dieta de ruminantes .....	18
2-Sistemas intensivos de produção de ovinos .....	18
3-Compostos secundários de plantas na alimentação de ruminantes .....	20
3.1- Óleos essenciais.....	21
3.1.1- Alho ( <i>Allium sativum</i> L.) .....	22
3.1.2- Canela ( <i>Cinnamomum cássia</i> ).....	22
3.1.3- Cravo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ) .....	22
3.1.4- Hortelã-pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) .....	23
3.1.5- Junípero ( <i>Juniperus communis</i> ).....	23
3.1.6- Laranja amarga ( <i>Citrus aurantium</i> ) .....	24
3.1.7- Melaleuca ( <i>Melaleuca alternifolia</i> ) .....	24
3.2- Extratos de plantas/óleos funcionais.....	25
3.2.1- Óleo de borragem ( <i>Borago officinalis</i> L.) .....	25
3.2.2- Óleo de cártamo ( <i>Carthamus tinctorius</i> ) .....	26
3.2.3- Óleo de gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> ).....	26
4- Aditivos naturais como redutores da metanogênese .....	27
5- Uso de óleos essenciais em dietas para ruminantes .....	30
6- Uso de ionóforos em dietas para ruminantes.....	32
7- Experimento <i>in vitro</i> de produção de gás.....	33
8- Parâmetros sanguíneos .....	33
8.1 Albumina .....	34
8.2 Triglicerídeos.....	34

8.3 Proteínas Plasmáticas (PPT) .....	34
8.4 Aspartato aminotransferase (AST).....	35
8.6 Ureia .....	35
8.7 Glutamiltransferase (GGT).....	35
8.8 Fosfatase alcalina (ALT) .....	35
CAPÍTULO II .....	37
Óleos essenciais como modificadores da fermentação ruminal em substituição a monensina sódica <i>in vitro</i> .....	38
INTRODUÇÃO .....	39
MATERIAL E MÉTODOS .....	40
RESULTADOS .....	43
DISCUSSÃO .....	44
CONCLUSÃO.....	47
Referências .....	47
CAPÍTULO III .....	51
Extratos de plantas como modificadores da fermentação ruminal de ovinos recebendo dietas com alto teor de concentrado.....	52
Introdução .....	53
Material e métodos.....	54
Resultados .....	61
Discussão.....	67
Conclusão .....	72
Referências .....	73
CAPÍTULO IV.....	78
Considerações finais .....	79
Referências bibliográficas .....	81
APÊNDICES.....	91
VITA .....	117



**RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

AGV: ácidos graxos voláteis  
ALH: alho  
AST: asparato aminotransferase  
BOR: borragem  
C<sub>2</sub>: acetato  
C<sub>3</sub>: propionato  
C<sub>4</sub>: butirato  
C<sub>2</sub>O: dióxido de carbono  
CAN: canela  
CAR: cártamo  
CH<sub>4</sub>: metano  
CP: compostos de plantas  
CSP: compostos secundários de plantas  
DDG: grãos de destilarias  
DMS: digestibilidade da matéria seca  
DMO: digestibilidade da matéria orgânica  
EB: energia bruta  
FA: fosfatase alcalina  
FDA: fibra em detergente ácido  
FDN: fibra em detergente neutro  
FP: fator de partição  
GER: gergelim  
GGT: gama glutamiltransferase  
H: hidrogênio  
HOR: hortelã pimenta  
JUN: junípero  
LAR: laranja amarga  
LIG: lignina  
MEL: melaleuca  
MO: matéria orgânica  
MON: monensina  
MS: matéria seca  
N<sub>2</sub>O: oxido nitroso  
N-NH<sub>3</sub>: nitrogênio amoniacal  
OE: óleos essenciais  
PG: produção de gás  
PPT: proteínas totais

## RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO I.....	12
Tabela 1: Propostas da avaliação de aditivos fitogênicos na alimentação de ruminantes.....	29
Tabela 2: Diferença em relação ao tratamento controle na manipulação da fermentação ruminal em dietas de bovinos de corte.....	30
Tabela 3: Diferença em relação ao tratamento controle na manipulação da fermentação ruminal em dietas de bovinos de leite.....	31
Tabela 4: Estatística descritiva de experimentos utilizando óleos essenciais, sua dose de compostos ativos (OE dose; g/kg MS da dieta) e as variáveis da fermentação ruminal.....	31
CAPÍTULO II.....	37
Tabela 1: Origem, parte extraída e densidade dos óleos essenciais utilizados no experimento.....	40
Tabela 2: Composição dos óleos essenciais utilizados no experimento.....	40
Tabela 3: Composição química dos alimentos utilizados.....	41
Tabela 4: Efeito do uso de óleos essenciais em 24h de fermentação <i>in vitro</i> .....	43
Tabela 5: Parâmetros fermentativos do uso de óleos essenciais em 24h de fermentação <i>in vitro</i> .....	44
CAPÍTULO III.....	51
Tabela 1: Dados de temperatura e umidade durante o experimento.....	55
Tabela 2: Composição química dos ingredientes da dieta.....	55
Tabela 3: Proporção dos ingredientes e composição química da dieta .....	56
Tabela 4: Desempenho de ovinos recebendo extratos de plantas com.....	61
Tabela 5: Consumo de nutrientes de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo.....	62
Tabela 6: Digestibilidade aparente de nutrientes e parâmetros fecais de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo.....	63

Tabela 7: Produção de metano de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo.....64

Tabela 8: Parâmetros ruminais de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo.....65

Tabela 9: Comportamento ingestivo (min/dia) de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo.....65

Tabela 10: Parâmetros sanguíneos de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo.....66

**RELAÇÃO DE FIGURAS**

CAPÍTULO I .....	12
Figura 1: Estratégias nutricionais para a redução do metano em ruminantes.....	28
CAPÍTULO III .....	51
Figura 1: Evolução do ganho de peso (kg) dos animais ao longo do experimento. Médias comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.....	62
Figura 2: Evolução do consumo médio de matéria seca (g) no início (20 dias), meio (40 dias) e fim do experimento (60 dias). * $P < 0,01$ pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.....	63
Figura 3: Evolução do escore corporal ao longo de 7 semanas de experimento. Médias comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.....	64
Figura 4: Produção cumulativa de gases dos diferentes extratos de plantas (MI) .....	66

## **CAPÍTULO I**

## Introdução geral

Os ruminantes contribuem para a mudança climática através da emissão de gases causadores do efeito estufa de forma direta (através da fermentação entérica e manejo do estrume) ou indiretamente (produção de alimentos e conversão de floresta em pastagem) (FAO, 2013). O metano entérico representa uma perda de energia produtiva na faixa entre 2% e 12% da ingestão energética bruta em ruminantes, dependendo do nível de ingestão de alimentos e da composição da dieta (Johnson & Johnson, 1995).

Várias estratégias nutricionais foram testadas para melhorar a fermentação ruminal, especialmente para diminuir a produção de metano, possibilitando aumentar o desempenho animal e a eficiência da utilização dos alimentos (Jouany & Morgavi, 2007). Essas estratégias podem ser feitas reduzindo o H<sup>+</sup> metabólico disponível para a metanogênese, com redutores alternativos para eliminação de H<sup>+</sup> (Bodas et al, 2012).

O uso de aditivos moduladores da fermentação ruminal, visando o aumento da eficiência alimentar em ruminantes, tem sido alvo de estudos da pesquisa há bastante tempo. Um dos aditivos mais utilizados é a monensina sódica, pelo fato de melhorar o aproveitamento de nutrientes e reduzir a incidência de distúrbios metabólicos nos animais. Contudo o seu uso está sendo questionado pela possibilidade de deixar resíduos nos produtos de origem animal. Desta forma, se abre caminho para o uso de fontes naturais que tenham função semelhante a dos ionóforos, e que possam ser aplicados de forma segura na nutrição animal.

Os metabólitos secundários de plantas eram considerados como fatores antinutricionais devido a efeitos adversos na utilização de nutrientes. Entretanto, muitos extratos de plantas foram estudados recentemente pela sua atividade antimicrobiana e capacidade de modificar a função intestinal em ruminantes, pelo aumento de enzimas relacionadas a absorção de nutrientes (Cobellis, 2016).

Os efeitos da suplementação com compostos de plantas são variados e muitas vezes contraditórios. (Yesilbag et al. 2016). Estudos para avaliar o consumo de ração e a digestibilidade *in vivo* são importantes para validar os resultados *in vitro*. O desafio para os estudos *in vivo* é identificar compostos com efeitos duradouros e sem deprimir a ingestão de alimentos e a digestão, bem

como a saúde e produtividade animal (Flachowsky & Lebzien, 2012). Além disso, a dose ótima de utilização tem que ser avaliada para a obtenção de uma redução significativa na metanogênese (Rira et al. 2015). Sendo assim, é possível que os compostos de plantas possam ser utilizados como promotores de crescimento naturais, trazendo benefícios na nutrição de ruminantes (Giannenas et al., 2013).

Desta forma, o presente estudo objetivou avaliar diferentes compostos de plantas com capacidade antimicrobiana comprovada, como aditivos moduladores da fermentação ruminal e suas eventuais consequências, para ovinos recebendo dieta com alto teor de concentrado.

## **Hipótese**

A utilização de compostos de plantas como aditivo na dieta de cordeiros com alto teor de concentrado altera a fermentação ruminal, promovendo alterações no consumo, nos parâmetros fermentativos e na digestão dos nutrientes. Isso, acaba repercutindo no desempenho, no comportamento ingestivo, nos parâmetros metabólicos e na emissão de metano entérico.

## **Objetivos gerais**

Avaliar diferentes compostos de plantas com capacidade antimicrobiana comprovada, como aditivos moduladores da fermentação ruminal, e as eventuais respostas nos animais.

## **Objetivos específicos**

Avaliar *in vitro* os efeitos da utilização de compostos de plantas sobre a digestibilidade, a produção cumulativa de gás, as produções de metano e, nitrogênio amoniacal, o pH e a concentração de ácidos graxos voláteis;

Avaliar o desempenho de ovinos que recebem compostos de plantas como fonte alternativa de aditivo;

Avaliar os efeitos da utilização de compostos de plantas sobre o consumo voluntário e digestibilidade dos nutrientes;

Avaliar os efeitos da utilização de compostos de plantas sobre o comportamento ingestivo de ovinos consumindo dieta com alto teor de concentrado;

Avaliar os efeitos da utilização de compostos de plantas sobre o pH, as concentrações de amônia ruminal e de ácido graxo voláteis do rúmen de ovinos consumindo dieta com alto teor de concentrado;

Avaliar o perfil metabólico dos ovinos;

Avaliar os efeitos da utilização de compostos de plantas sobre a emissão de metano entérico dos ovinos.



## Revisão bibliográfica

### 1-Sistemas intensivos sustentáveis de produção de ruminantes

Os cereais são a mais importante fonte de alimentos do mundo, tanto para o consumo humano direto, como para a produção de carne. Segundo pesquisas, aproximadamente um terço da produção de cereais é destinada ao consumo animal, onde serão necessários bilhões de toneladas extras de cereais até 2030 (FAO, 2002). Os grãos, principalmente o milho, são usados em proporções de até 90% na matéria seca (MS) em dietas de animais em confinamento, e em quantidade menores em dietas de vacas leiteiras de alta produção (40-60% na MS), e em menores proporções para animais a pasto, como forma de suplementação. Seu uso em adequadas proporções é considerado como uma estratégia de mitigação de metano entérico nos ruminantes (Beauchemin *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2010; Hristov *et al.*, 2014; Knapp *et al.*, 2014; Tadesse, 2014;). De maneira geral, a medida que aumenta a quantidade de grão na dieta se reduz a emissão de gás (Johnson & Johnson, 1995).

Dada a relação entre a digestibilidade da MS, o consumo e a emissão de metano (Jonhson & Jonhson, 1995; Boadi *et al.*, 2001; Ellis *et al.*, 2008; Hegarty, 2009), existe uma redução na emissão quando o amido da dieta é maior que 40% (Sauvant e Giger-Reverdin, 2007). Aumentar a presença de carboidratos digestíveis na dieta é considerado como uma estratégia de mitigação mais eficiente por unidade de energia consumida (Haque *et al.*, 2014).

Em um ambiente ruminal ácido, característico de animais que consomem grandes quantidades de carboidratos, a população e a atividade das bactérias gram-positivas e protozoários é afetada, reduzindo a produção de acetato e butirato, sendo deste modo reduzida a disponibilidade de H<sup>+</sup> para a síntese de metano (Martin *et al.*, 2010). Por outro lado, devido a maior presença e atividade em ambientes ácidos das bactérias gram-negativas, normalmente amilolíticas, o H<sup>+</sup> disponível é utilizado para a produção de propionato (Martin *et al.*, 2010), cuja concentração se relaciona diretamente com menores emissões de gases de efeito estufa (Jonhson & Jonhson, 1995; Moss *et al.*, 2000).

A menor relação de acetato:propionato, as combinação de fatores como o aumento do consumo e a digestibilidade aparente da MS e fibra, a maior taxa de passagem das dietas com maior conteúdo de grãos se relacionam com menores emissões de metano (McGeouch *et al.*, 2010).

O propionato é absorvido no rúmen e transformado em glicose no fígado, e essa glicose, é usada no tecido mamário e muscular para alcançar níveis de produção que somente com uma dieta a pasto se tornaria impossível de obter (Da Silva *et al.*, 2016).

Entre os fatores que influenciam o potencial de mitigação desta estratégia estão o nível de inclusão, o tipo de processamento do cereal, e em pastejo se relaciona ao valor nutritivo e a disponibilidade da pastagem. Os benefícios produtivos (Owens *et al.*, 1997) e de mitigação (Johnson & Johnson, 1995) pelo uso de grãos são amplamente conhecidos. Desta forma, para fazer uma interpretação completa do balanço de carbono dos sistemas de produção de carne e leite, é necessário fazer um estudo completo, incluindo as emissões dos demais gases de efeito estufa (N<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub>) liberados durante o processo de produção, armazenamento e transporte dos animais (Mc Geough *et al.*, 2010).

### 1.1- Nível de inclusão de grãos na dieta

A energia bruta (EB) perdida na forma de metano é de 2 a 4% em dietas de confinamento (Jonhson e Jonhson, 1995) e 5.3 a 6% para vacas leiteiras de alta produção (Benchaar *et al.*, 2013), ficando na faixa de 2 a 12% de EB perdida. Animais alimentados a base de pasto têm um maior gasto energético pelo deslocamento em busca de comida, sendo essa uma vantagem de animais em regime de confinamento.

Mc Geough *et al.* (2010) observaram menor emissão de metano por kg de MS consumida conforme aumentava a participação de grãos na silagem. Doreau *et al.* (2011), observaram uma redução de metano em relação a EB consumida (3,0 vs 6,2 e 6,7%), ao consumo (10,2 vs 20,2 e 22,6 g CH<sub>4</sub> kg/MS) e ao peso vivo (33,5 vs 89,7 e 89,1 g CH<sub>4</sub>/kg), em uma dieta com alto teor de concentrado (86,5%), versus uma confeccionada com feno de baixa qualidade (48,8 %) e outra com silagem de milho (63,5%), sem encontrar diferença entre essas últimas. Haque *et al.* (2014), ao oferecer a vacas lactantes uma dieta com 27,5% de amido na MS, não encontraram diferenças significativas na emissão de metano (g por kg de consumo de MS), comparado com uma dieta com pouco amido (21,7%). Os autores concluíram que a falta de efeito foi devido a pouca diferença entre o conteúdo de amido de ambas as dietas. Esses resultados corroboram com os encontrados por Hassanat *et al.* (2013), que não encontraram efeito mitigador em dietas com até 50% de silagem de milho como fonte de amido, mas sim com uma dieta com 100% de silagem. Estes resultados mostram a importância de considerar a quantidade de carboidratos potencialmente digestíveis que deve ter a dieta para exercer um efeito mitigador.

Por outro lado, não é todo incremento na proporção de cereais da dieta que reduz as emissões de metano. Por exemplo os grãos de destilarias (DDG's) tem relativamente altas concentrações de gordura, proteína e fibra (Klopfestein *et al.*, 2008; Hales *et al.*, 2013). Conforme aumenta a sua inclusão na dieta, pode-se reduzir o consumo de MS e diminuir a digestibilidade do alimento. Os autores observaram um aumento linear na emissão de metano, a medida que aumentava o nível de DDG's na dieta na proporção de 0 a 45%. Desta forma, contrasta com o descrito por McGinn *et al.* (2009), que observaram menor emissão, e com o observado por Hales *et al.* (2012), que não encontraram efeito sobre a produção de metano ao incluir DDG's até 30% na MS.

### 1.2- Tipo e processamento do grão

O valor energético dos cereais, juntamente com a resposta animal, dependem de suas características físicas e químicas (Cole *et al.*, 2009), as quais podem ser modificadas pelo tipo de processamento do grão (Owens *et al.*, 1997). As mudanças que ocorrem na digestibilidade e consumo de nutrientes, e na fermentação no rúmen pelo processamento tem implicação sobre a emissão de metano e o desempenho animal (Owens *et al.*, 1997). Hales *et al.* (2012), reportaram que dietas com milho floculado, consumidos por bovinos em confinamento, geraram menos metano que aquelas elaboradas com milho seco (11,65 vs 14,06 kg/MS consumida), ao qual representou uma menor perda de energia em forma de gás (2.43 vs 3.04 % EB). De forma similar Hünerberg *et al.* (2013), verificaram menor emissão em uma dieta com DDG's em comparação a cevada e canola (21,5 vs 23,9 e 25,3 g CH<sub>4</sub> kg/MS, respectivamente), na qual

apresentou menor perda de energia na forma de metano (6,6 vs 7,3 e 7,8 % EB, respectivamente).

O grão moído ou peletizado, se torna mais disponível para os microrganismos do rúmen, o que promove uma maior taxa de passagem e aumenta a proporção molar de propionato, no qual pode explicar a menor emissão a partir de forragens processadas (Boadi et al., 2001). No entanto, este efeito não se mantém quando se restringe o consumo (Bonuilla & Lemus, 2012), devido a problemas metabólicos pela redução do pH ruminal.

### **1.3- Emissões de gases associadas ao uso de grãos na dieta de ruminantes**

Os benefícios do uso de cereais na dieta de ruminantes em relação a redução na emissão de metano são bem conhecidos. O custo-benefício desta prática depende do preço do insumo, da eficiência alimentar, das taxas de ganho e da sua qualidade. Desta forma, alimentar animais com grande quantidade de grãos não é sempre possível devido às restrições econômicas (Kumar et al., 2014). Por outro lado, os ruminantes são animais com uso ineficiente da energia contida nos alimentos, devido à partição de energia durante os processos digestivos e metabólicos (NRC, 2001).

Em sistemas de produção animal o uso de combustíveis, de fertilizantes e químicos, bem como o armazenamento, o processamento e o transporte, acabam aumentando as emissões de gases de efeito estufa (Beauchemin et al., 2008; Doreau *et al.*, 2011; Gerber et al., 2013). Estas emissões, principalmente de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, são geralmente desconsideradas durante o processo de produção animal. Portanto, para fazer uma interpretação completa do balanço de carbono da produção de carne e leite baseada em grãos, é necessário estudar o ciclo completo, incluindo as emissões dentro e fora da unidade de produção (Mc Geough et al. 2010), que são específicas para as condições econômicas, tecnológicas e climáticas de cada região. Por exemplo, Doreau et al. (2011) com este tipo de análise, comparou três sistemas de engorda de touros jovens e encontrou que as dietas com alto teor de concentrado (86%) reduziram fortemente as emissões de CH<sub>4</sub>, expressos em g kg de MS consumida, em comparação com dietas à base de feno-concentrado (49:51%) e silagem de milho-concentrado (63:37%).

## **2-Sistemas intensivos de produção de ovinos**

A produção animal desempenhará um papel importante no fornecimento de alimentos para uma população mundial cada vez maior, mais urbanizada, e com maior poder de compra, que deverá ser de 9,6 bilhões de pessoas até 2050 (Gerber et al., 2013). É uma expansão contínua para garantir a segurança alimentar, pressionando os recursos naturais e o meio ambiente, tendo em vista sua alta pegada de carbono (Steinfeld et al., 2006; IPCC, 2007). Além disso, os sistemas de produção com ruminantes não só terão que aumentar a produtividade, mas também a qualidade dos produtos, devido à consciência social da presença de resíduos químicos sobre eles (Russell & Houlihan, 2003).

Os sistemas de criação de ovinos no Brasil e no mundo são extremamente variáveis, sendo possível encontrar desde animais confinados em um sistema

intensivo até animais criados extensivamente, muitas vezes quase em estado selvagem. Não há um sistema padrão que possa funcionar adequadamente em todas as regiões, pois as condições climáticas, taxas de lotação, área disponível para a criação, disponibilidade e qualidade de forragens são muito diferentes (Sá, 2012).

O confinamento de cordeiros apresenta uma série de benefícios, como menor mortalidade dos animais devido à menor incidência de verminoses (Siqueira et al., 1993). A maximização do uso de concentrados no confinamento acarreta, geralmente, aumento do custo de produção e maior possibilidade de ocorrência de distúrbios fisiológicos nos animais. Entretanto, permite rações com maior concentração de nutrientes, o que pode ser interessante quando se dispõe de animais com alto potencial para ganho de peso (Gastaldi & Sobrinho, 1998).

O confinamento melhora os índices de produtividade, por reduzir a idade de abate, por produzir animais para abate na entressafra e à possibilidade de obter melhores preços (Restle et al., 1999). Porém, pelo fato de o maior custo fixo do sistema ser com a alimentação (respondendo a mais de 70% do custo total), deve-se levar em conta que a maior resposta biológica pode não ser a maior resposta econômica.

De acordo com Bendahan (2006), a decisão da utilização do confinamento de cordeiros é puramente econômica, na qual fatores como velocidade de acabamento, conversão alimentar, qualidade dos animais disponíveis, preço e qualidade da alimentação e mercado demandador de carne de qualidade devem ser levados em conta sistematicamente, para que o produtor obtenha ganho econômico na atividade.

A terminação de cordeiros em confinamento aumenta a taxa de lotação da propriedade, pois propicia a liberação de área para outras categorias, como para a recria das borregas, possibilitando melhores condições alimentares para a recria destas (Frescura et al., 2005). Outra vantagem do confinamento de cordeiros é a baixa mortalidade dos animais, em razão do maior controle sanitário e nutricional, que resulta em abate precoce e carcaças de qualidade (Siqueira et al., 1993).

Segundo Bueno et al. (2000), um dos fatores mais preponderantes para a expansão e a consolidação do mercado da carne ovina no Brasil, é a qualidade da carcaça, sendo fundamental a padronização das carcaças em função do tamanho, percentual de músculos, cobertura de gordura subcutânea e teor de gordura adequada ao mercado consumidor. Nesse contexto a carne de cordeiros possui a maior aceitabilidade do mercado consumidor pelas suas características de sabor e maciez, dentre as diversas categorias de ovinos.

O balanceamento de dietas no confinamento de ovinos representa a diferença da rentabilidade ou não da atividade. Dietas com elevada concentração de fibra em detergente neutro, necessariamente, possuem baixa densidade energética e a repleção ruminal que limita a ingestão de matéria seca, reduzindo o desempenho animal (Mertens, 1994). Dietas com alto teor de concentrado tornaram-se economicamente viáveis nos últimos anos, em função da elevação no custo de produção de volumosos, redução no preço dos concentrados através da compra direta com o produtor e ao aumento da oferta de coprodutos da indústria (Cervieri, 2009).

Entretanto, a ingestão de dietas ricas em grãos pode levar a ocorrência de distúrbios no rúmen, pois favorece a rápida queda do pH ruminal, devido a altas taxas de digestão e produção de ácidos graxos voláteis. Nessas condições

as bactérias amilolíticas pertencentes ao gênero *Prevotella* podem ser substituídas por bactérias gram-positivas como *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp, produtoras de lactato. As bactérias que utilizam o lactato, como a *Veillonella* e *Selenomonas*, são sensíveis a ambiente com pH baixo e a redução dessas bactérias tem como consequência o acúmulo de ácido láctico no rúmen, resultando em acidose láctica (Owens & Goetsch, 1993). Por isso, o uso de aditivos na dieta pode modular a fermentação ruminal de forma positiva ao animal.

### 3-Compostos secundários de plantas na alimentação de ruminantes

A utilização de antibióticos na alimentação animal recebe repressão social devido às suspeitas de deixar resíduos na carne. Com isso, a utilização de aditivos naturais com funções semelhantes a dos antibióticos seria uma alternativa na dieta de ruminantes (Brugalli, 2003). Existe um grande número de metabólitos de plantas com atividade antibiótica. Uma pesquisa na literatura usando os termos "antibióticos de plantas", gerou mais de 5000 referências. Devido a grande quantidade de compostos identificados, a maioria nunca será especificamente testada em ruminantes (Rochfort et al., 2008).

Os principais compostos secundários utilizados na nutrição de ruminantes com potencial na modulação da fermentação são: taninos, saponinas e óleos essenciais. Os taninos são polímeros polifenólicos solúveis em água de peso molecular relativamente elevado e têm capacidade para formar complexos principalmente com proteínas devido à presença de um grande número de grupos hidroxilo fenólicos. Eles ocorrem em muitas árvores forrageiras nutricionalmente importantes, arbustos e leguminosas bem como em frutas, cereais e grãos. Os taninos são geralmente classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis (HT) e taninos condensados (CT) (Patra & Saxena, 2010). Em um experimento *in vivo* com cabras os taninos foram capazes de reduzir em 43% a produção de metano, também reduzindo a população de protozoários e de bactérias metanogênica (Animut et al. 2008). No experimento *in vitro* realizado por Patra et al. (2006) os taninos reduziram até 100% a produção de metano, porém foi reduzida também a digestibilidade da matéria seca. Lila et al. (2003) observaram em um experimento *in vitro* que as saponinas são capazes de reduzir a produção de metano em até 58%, aumentar a produção de ácidos graxos voláteis, reduzir a relação C2:C3 e a população de protozoários. Em um experimento *in vivo* com cordeiros, com duração de 60 dias, as saponinas também foram capazes de reduzir a produção de metano em 28%, aumentou a produção de ácidos graxos voláteis e reduziu a população de protozoários e de bactérias metanogênicas (Mao et al. 2010).

As saponinas podem envolver a supressão do crescimento dos protozoários, que é responsável por uma maior produção de propionato e menor relação acetato:propionato. No entanto, a diminuição da produção de metano pelos taninos pode ser devida à inibição de protozoários, de bactérias metanogênicas e, em menor extensão, de populações microbianas produtoras de hidrogênio. Para os óleos essenciais, a depressão da produção de metano pode implicar a inibição de bactérias metanogênicas, microrganismos ruminais que produzem hidrogênio e, em menor grau, protozoários, resultando em redução nas concentrações de propionato e acetato e aumento da relação acetato:propionato (Patra, 2010).

Dentre os possíveis mecanismos de ação dos compostos secundários de plantas no organismo animal, podem-se citar a atuação na microflora intestinal, o aumento na digestibilidade e na absorção de nutrientes, o estímulo da atividade enzimática, a melhora da resposta imune, o controle na produção de amônia, bem como modificações morfo-histológicas do trato gastrointestinal e atividade antioxidante (Brugalli, 2003). Esses compostos podem, ainda, modular a população ou a atividade metanogênica e afetar a distribuição entre as espécies metanogênicas.

Grupos de pesquisa em todo o mundo estão trabalhando no desenvolvimento de compostos naturais ou sintéticos que inibam diretamente a metanogênese do rúmen (FAO, 2013), porém, estudos *in vivo* são necessários para avaliar o uso destes compostos em longo prazo.

### 3.1- Óleos essenciais

O aumento da resistência antibacteriana dos microrganismos e o aparecimento de resíduos na carne e no leite tem desencorajado o uso de antibióticos na alimentação animal. Deste modo, tem havido um interesse crescente na exploração de metabólitos secundários de plantas como modificadores naturais (Pawar et al, 2014). Os óleos essenciais (OE) e seus compostos provaram sua eficácia *in vitro* como agentes antimicrobianos, antioxidantes, imunomoduladores e anti-inflamatórios. Estes compostos merecem um lugar importante como aditivos alimentares que são geralmente considerados como seguros (Giannenas et al., 2013). Alguns têm se mostrado promissores na mitigação da emissão de metano pelos ruminantes devido aos seus efeitos diretos na metanogênese, nos protozoários, na digestão dos alimentos e na fermentação (Cobellis et al., 2016).

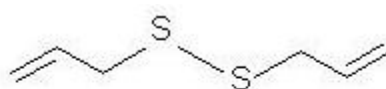
Vários são os óleos essenciais, porém alguns deles, tais como o timol (extraído do tomilho), carvacrol (extraído do orégano), alina e alicina (extraídos do alho), citrol e citronolol (extraídos de diversas plantas cítricas), mentol (extraído da menta) e cinamaldeído (extraído da canela) já possuem sua funcionalidade conhecida (Velluti et al., 2003). Os óleos essenciais são obtidos a partir de diferentes partes da planta, tais como, folhas, raízes, caule ou de mais de uma parte, sendo que a melhor tecnologia para a extração destes óleos essenciais é por destilação a vapor, quando comparadas pela extração com metanol ou acetona (Burt, 2004).

Segundo alguns trabalhos, os óleos têm a capacidade de reduzir a produção de metano pela concorrência de substrato para a produção de propionato e a redução da metanogênese (Cieslak et al., 2013). Alterar o padrão fermentativo, reduzindo a relação C<sub>2</sub>:C<sub>3</sub>, torna o rúmen energeticamente mais eficiente e reduz a geração de CH<sub>4</sub>. Ao se produzir propionato não há produção de H<sup>+</sup> como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato. Além disso, as vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H<sup>+</sup> (Van Soest, 1994).

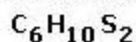
A variabilidade nas respostas podem estar relacionada a diferenças no tipo, concentração e atividade de compostos secundários, que provavelmente serão afetados pela planta, ambiente de crescimento, processo de pós-colheita (Patra et al., 2006, Salem et al., 2012), o método de extração (Yang et al. 2010), as doses empregadas (Busquets et al., 2006) e, finalmente, o consumo de um ingrediente ativo específico por parte dos animais (Frutos et al., 2004).

### 3.1.1- Alho (*Allium sativum* L.)

O alho contém cerca de 0,3% da composição volátil de seu óleo formada por compostos sulfurados, dos quais se destacam a alicina e o dissulfeto de dialila. Seu óleo é obtido por arraste de vapor dos bulbos frescos. Outros componentes importantes incluem a aliina, sulfóxido de S-metil-L-cisteína, proteínas (16,8% do peso seco), minerais (principalmente selênio), vitaminas, glucosinolatos e enzimas (Padetec, 2016). Busquet et al. (2005) testaram os efeitos do óleo essencial de alho produção de CH<sub>4</sub> e observaram que quando foi adicionado 300 mg/L em 17 h de fermentação *in vitro* diminuiu a produção de CH<sub>4</sub> em 19,5% e a concentração de AGV, sem alterar a digestibilidade.

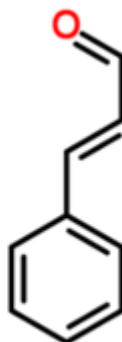


DISSULFETO DE DIALILA



### 3.1.2- Canela (*Cinnamomum cássia*)

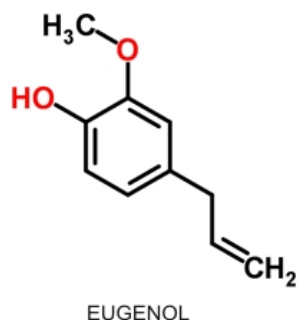
O óleo essencial da canela pode ser extraído tanto das cascas quanto das folhas por destilação a vapor, sendo formada praticamente pelo componente cinamaldeído em mais de 80%. Embora o cinamaldeído seja o componente principal e mais ativo no óleo de canela, outras substâncias dentro do óleo de canela podem interagir com o cinamaldeído (Casamiglia et al., 2007). Macheboeuf et al. (2008) reduziram a produção de CH<sub>4</sub> em 26% ao adicionar 500 mg/L de óleo de canela.



CINAMALDEÍDO

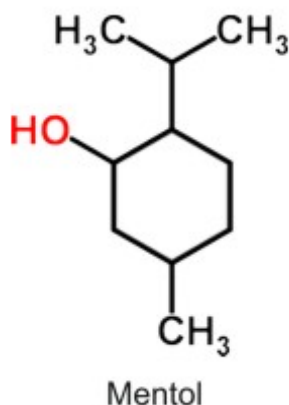
### 3.1.3- Cravo (*Syzygium aromaticum*)

O óleo é extraído dos botões floríferos da planta por destilação a vapor, sendo seu rendimento alto visto que a planta produz grande quantidade de botões. Sua composição química é constituída principalmente por eugenol, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico, e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis (Silvestri et al., 2010) Seu principal componente é o eugenol, sendo encontrado em mais de 80% do óleo. Patra e Yu (2012) observaram redução linear na produção de CH<sub>4</sub> e amônia ao adicionar o óleo de cravo *in vitro*, porém a DMS foi reduzida.



### 3.1.4- Hortelã-pimenta (*Mentha piperita*)

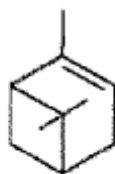
É um importante óleo obtido por destilação a vapor, sendo utilizado para fazer gomas de mascar, produtos de higiene pessoal e perfumarias. A pulegona,  $\alpha$ -pineno, sabineno,  $\beta$ -pineno, 3-octanol, 1,8-cineol, limoneno, piperitona, acetato de neomentila, acetato de mentila, t-cariofileno, farneseno, isomentona, neomental, isomentol, mentofurano, mentol e a mentona são os principais componentes do óleo, sendo os três últimos de maior valor econômico, embora sejam conhecidos mais de 200 componentes (Tavish & Harris, 2002). Agarwal et al. (2009) avaliaram os efeitos do óleo essencial da Hortelã-pimenta (0,33, 1,0 e 2,0 mL) *in vitro*, e observaram que a produção de metano reduziu linearmente com os níveis crescentes do óleo, porém a digestibilidade e a produção de AGV também foram reduzidos.



### 3.1.5- Junípero (*Juniperus communis*)

O óleo é obtido por destilação a vapor de suas folhas e bagas, sendo o seu rendimento baixo. O mesmo possui odor característico de pimenta. Seus componentes são: alfa-pipeno, sabineno, limoneno, mirceno e outros hidrocarbonetos monoterpênicos. Yesilbag (2016) destacou a capacidade antioxidativa desse óleo. Chaves et al. (2008) ao adicionar *in vitro* o óleo de junípero na dieta, reduziram a população de bactérias metanogênicas e como consequência houve uma redução nas produções de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ .

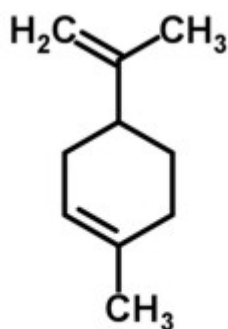




$\alpha$ -pineno

### 3.1.6- Laranja amarga (*Citrus aurantium*)

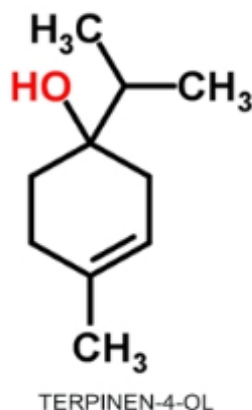
O óleo é um líquido amarelo claro, de consistência fina obtido por prensagem a frio das cascas desse tipo de laranja. Sarrou et al. (2013), verificaram que o óleo essencial da casca do fruto tinha como principais constituintes o limoneno seguido do mirceno, linalol,  $\beta$ -pineno e  $\alpha$ -pineno. Seu principal constituinte é o limoneno, estando presente em mais de 90% do óleo. O limoneno também está presente no óleo essencial de limão, porém em menor quantidade. Joch et al. (2016) ao adicionar 1  $\mu$ /L de limoneno na dieta observaram redução em 29% a produção de metano *in vitro*.



Limoneno

### 3.1.7- Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

O óleo dessa planta é um líquido amarelo com maior viscosidade, extraído por arraste a vapor das folhas e ramos, sendo seu rendimento baixo. Com mais de 100 componentes, existem dois significantes: o cineol com limite máximo estabelecido de 15% de concentração, notório irritante da pele, e o terpinen-4-ol, principal responsável por suas propriedades medicinais, especialmente as antimicrobianas, com concentração acima de 30%, é apontado como o maior agente na atividade antimicrobiana dentre os componentes (Da Silva e Mejia, 2016).



### 3.2- Extratos de plantas/óleos funcionais

Todo óleo essencial é considerado um óleo funcional, porém nem todo óleo funcional é considerado um óleo essencial, pelo fato de um óleo essencial ser considerado metabólitos secundários de plantas e especiarias. Os compostos naturais possuem ação semelhante aos ionóforos, levando a uma melhoria nos processos benéficos da fermentação ruminal e redução dos processos ineficientes. Acredita-se também que os óleos funcionais podem estimular a produção de saliva e sucos gástricos e pancreáticos, favorecendo a secreção de enzimas, aumentando assim a digestibilidade (Mellor, 2000). Os fitoquímicos, principalmente metabólitos secundários de plantas, são de grande interesse por serem produzidos naturalmente pelas plantas e podem ser facilmente adicionados nas formulações de rações (Wang et al. 2016).

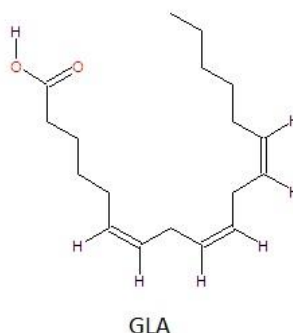
Devido a importância da segurança alimentar como atributo decisivo no momento da compra, com progressiva demanda por produtos saudáveis e produzidos sob preceitos ambientais (Ojeu, 2003) abre-se caminho para aditivos oriundos de fontes naturais, que melhoram o desempenho animal.

#### 3.2.1- Óleo de borragem (*Borago officinalis* L.)

A borragem é uma planta anual nativa da região do Mediterrâneo e sul da Europa e cultivada em várias partes do mundo. Sua característica mais marcante é a camada de pelos que recobre toda a planta. A borragem atinge entre 60 e 100cm de altura e produz flores pequenas de coloração azul a lilás. Para a extração do óleo são utilizadas as folhas e flores da planta (Fitoterápicos, 2016).

O óleo de borragem é utilizado pelo seu relevante conteúdo de ácido  $\gamma$ -linolênico (GLA;  $\omega$ -6), um ácido graxo poliinsaturado da série  $\omega$ -6-, ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), ácido graxos poliinsaturados da série  $\omega$ -3 e inúmeros outros ácidos graxos poliinsaturados. O GLA é encontrado apenas no leite materno, no óleo de *Enotera* e no óleo de borragem, que representa a mais abundante fonte vegetal deste ácido graxo essencial (contendo cerca de 20%) (Inkanat, 2016).

Kišidayová et al. (2006) avaliaram o uso de óleo de borragem em um período de seis dias *in vitro*, com líquido ruminal de carneiros, onde a população de protozoários ciliados foi reduzida ( $P < 0,05$ ). Jalc et al. (2005) em um experimento *in vitro* adicionaram óleo de borragem a dieta, sendo que não encontraram diferenças na degradação da matéria seca, pH, nitrogênio amoniacal, e com uma redução numérica de apenas 2% na produção de metano.

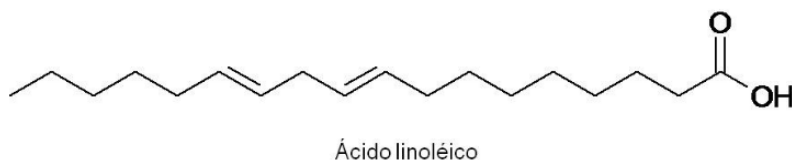


### 3.2.2- Óleo de cártamo (*Carthamus tinctorius*)

O cártamo, família das Asteraceas, é uma oleaginosa sem tradição de cultivo no Brasil. Pode ser considerada uma planta rústica, resistente às adversidades climáticas e seus grãos podem conter até 40% de óleo (Giayetto et al., 1999).

Com origem na Índia, é uma planta que tem sido tradicionalmente usada como corante alimentar. Sendo considerada uma espécie de açafraão, utilizada para dar cor e sabor aos ensopados. Esse óleo é extraído das sementes da planta através de um processo muito semelhante ao azeite de oliva (Portal da educação, 2016). As sementes de cártamo são ricas em um óleo no qual predominam ácidos graxos do tipo mono e poliinsaturados (PUFA/ SFA) (90%), sendo composto principalmente pelo ácido oléico (20-30%) e ácido linoléico (55-88%), gorduras do tipo ômega 9 e 6, respectivamente. Rico em ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados, o óleo de cártamo tem a propriedade de promover estímulos de saciedade por aumentar a leptina (Naturell, 2016).

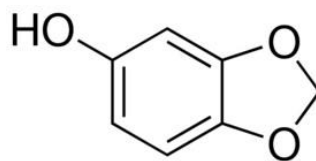
Encinias et al. (2004) ao suplementarem ovelhas com sementes de cártamo nos últimos 45 dias da gestação e verificaram aumento na taxa de natalidade de cordeiros devido ao teor de ácido linoléico.



### 3.2.3- Óleo de gergelim (*Sesamum indicum*)

O óleo de gergelim é sucedâneo do óleo de oliva, é pouco alterável pelo ar, é fluido, com cor amarelo claro a transparente, sabor de amêndoas característico, com odor pouco pronunciado (Moretto & Fett, 1998). O óleo de gergelim possui aroma característico e agradável e maior estabilidade oxidativa, quando comparado a outros óleos vegetais, por causa da sua composição de ácidos graxos e pela presença dos antioxidantes naturais, sesamina, sesamolina, sesamol e gama tocoferol (Fukuda et al., 1986; Yoshida, 1994). O sesamol com suas propriedades antioxidantes confere ao óleo uma elevada estabilidade química, evitando a rancificação, sendo dentre os demais, o que apresenta a maior resistência à oxidação (Beltrão et al., 1994). O óleo é rico em ácidos graxos insaturados, contendo aproximadamente 47% de ácido oléico e 39% de ácido linoléico, também possui vitaminas lipossolúveis e metionina (Andrade et al, 2014). Omar (2002) relatou melhora no ganho de peso,

conversão alimentar, e digestibilidade da proteína e fibra bruta ao incluir óleo de gergelim na dieta de cordeiros confinados.



Sesamol

#### 4- Aditivos naturais como redutores da metanogênese

Os ruminantes abrigam um ecossistema microbiano complexo no rúmen, que são responsáveis pela fermentação da fibra e nitrogênio não proteico, para fornecer nutrientes aos animais hospedeiros, mas, durante o processo, uma quantidade significativa de energia dietética é desperdiçada na forma de metano, reduzindo assim a eficiência alimentar dos animais (Samal et al., 2016).

O setor pecuário representa uma fonte significativa de emissões de gases de efeito estufa em todo o mundo, gerando dióxido de carbono, metano e óxido nitroso ao longo do processo produtivo (FAO, 2013). A metanogênese é um processo metabólico essencial no rúmen que atua como dissipador de hidrogênio. A inibição da metanogênese é essencial para manter a adequada fermentação no rúmen, aumentando a eficiência de conversão alimentar e reduzindo a poluição ambiental (Pawar et al, 2014).

As maiores fontes de emissão de CH<sub>4</sub> considerando as atividades agropecuárias são representadas pela fermentação entérica em ruminantes, produção de arroz em terrenos alagados e fermentação de dejetos (Olesen et al., 2006). O metano é eliminado por ruminantes e sua produção é proveniente da fermentação ruminal, que está relacionada ao tipo de animal e ao consumo e à digestibilidade do alimento. Também existem outros gases com menor impacto ambiental gerados pela pecuária que são o CO<sub>2</sub> e o N<sub>2</sub>O.

Assim, existe a possibilidade da redução na produção de metano pela modificação da fermentação ruminal, obtida por alteração do volumoso, do tipo e da quantidade de carboidrato suplementado à dieta, pela adição de lipídeos e pela manipulação da microbiota do rúmen com aditivos alimentares (Figura 1) (Mohammed et al., 2004).

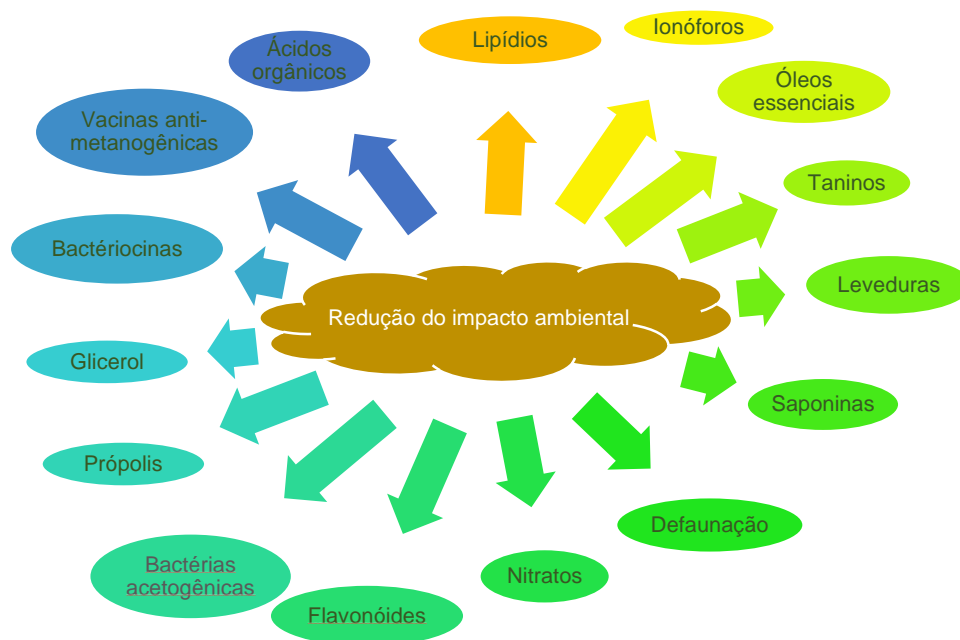


Figura 1: Estratégias nutricionais para a redução do metano em ruminantes

Os resultados mais promissores da pesquisa foram obtidos a partir de alguns aditivos alimentares como probióticos, lipídios dietéticos, ácidos orgânicos, enzimas e compostos secundários de plantas. Os aditivos ideais devem diminuir a produção de metano reduzindo a taxa de degradação de carboidratos facilmente fermentáveis para reduzir o risco de acidose ruminal e melhorar a digestão das fibras (Jouany & Morgavi, 2007).

Compostos fenólicos (timol, eugenol, carvacrol) ou óleos essenciais com altas concentrações destes fenólicos, óleo de canela e seu componente principal cinamaldeído, óleo essencial de alho e seus derivados, em particular dissulfeto dialílico e outros óleos essenciais podem ser eficazes, pelo menos *in vitro* na diminuição da produção de  $\text{CH}_4$  (Benchaar, 2011). Também a associação entre óleos essenciais pode apresentar resultados valiosos na redução da metanogênese, porém pode haver efeito competitivo entre os compostos.

O metano pode ser afetado por um efeito seletivo dos óleos essenciais através da inibição direta das *archaea* metanogênicas e/ou depressão dos processos metabólicos microbianos envolvidos na metanogênese (Bodas et al., 2012). A utilização de recursos que atuem na redução da emissão de  $\text{CH}_4$  de origem ruminal resultam em benefícios econômicos, pela maior eficiência na utilização dos alimentos e, principalmente, benefícios para o meio ambiente (McGinn et al., 2004).

Os aditivos são usados para melhorar a relação simbiótica entre os microrganismos presentes no rúmen e seu hospedeiro, favorecendo os processos fermentativos no rúmen em animais que recebem dietas com alto teor de carboidratos não fibrosos (Franzolin et al., 2000). Desta forma, aumenta o desempenho animal e a eficiência da utilização dos alimentos por melhorar geneticamente os microrganismos ruminais (Jouany & Morgavi, 2007).

Segundo Cardozo et al. (2005) os óleos essenciais são dependentes do pH para apresentarem o seu potencial. Desta forma, dietas com baixo pH (5,5), quando comparadas a um pH alto (7,0) são capazes de aumentar a concentração de ácidos graxos voláteis (principalmente propionato) e reduzir a quantidade de amônia. Em uma meta-análise Khiaosa-ard & Zebeli (2013)

compararam a reposta *in vivo* do uso de inúmeros óleos essenciais e a espécie animal que apresentou a melhor resposta e menor variabilidade dos dados foram os bovinos de corte, quando comparados com pequenos ruminantes e gado de leite. Os autores justificam essa resposta pelo fato de os bovinos testados receberem dietas mais padronizadas e com maior teor de concentrado, tendo um pH ruminal mais baixo na média de 6.05, versus um pH de 6.31 e 6.22 respectivamente para pequenos ruminantes e vacas de leite.

Os resultados sobre a atividade anti-metanogênica dos metabólitos secundários das plantas indicam o seu potencial para serem utilizados como aditivos na alimentação para reduzir a produção de metano, mas o mecanismo da sua ação necessita de uma investigação detalhada (Rira et al., 2015). Na tabela 1 são propostos as cinco importante etapas para realização de pesquisas com compostos fitogênicos.

Tabela 1: Propostas da avaliação de aditivos fitogênicos na alimentação de ruminantes (adaptado de Flachowsky & Lebzien, 2012).

Estágio	Tipo de estudo	Estratégia
1	Caracterização das plantas	Descrição das plantas, condições de cultivo, estágio vegetativo na colheita, tipo de processamento
2	Caracterização analítica	Estrutura química da (s) molécula (s) e seu (s) grupo (s) funcional (is). Caracterização de impurezas, determinação analítica em premix e dietas
3	Estudos <i>in vitro</i>	Ensaio dos efeitos de várias substâncias na fermentação do rúmen em (estudos de nível de dose, diferentes dietas, etc.), <i>screening</i> de várias substâncias
4	Estudos <i>in vivo</i>	Influência da (s) substância (s) na ingestão de ração, na fermentação ruminal, na digestibilidade, e nas emissões de metano, principalmente em animais fistulados
5	Estudos a longo prazo, com diferentes espécies animais e categorias	Influência da (s) substância (s) na saúde animal, no desempenho e na fertilidade. Na adaptação dos microrganismos do rúmen, segurança e qualidade dos alimentos de origem animal,

bem como o impacto ambiental.

## 5- Uso de óleos essenciais em dietas para ruminantes

Aditivos de fontes naturais como os compostos secundários de plantas e seus componentes bioativos vem sendo avaliados como substitutos do uso de antibióticos. Resultados *in vitro* apontam que os óleos essenciais (OE) inibem determinados microrganismos (bactérias gram-positivas, metanogênicas e protozoários) reduzindo o acúmulo de amônia e a produção de metano entérico.

Nas tabela 2, 3 e 4 são apresentados os resultados de trabalhos envolvendo o uso de OE como aditivo na alimentação de ruminantes. Cada óleo possui diferentes funções: antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antioxidante, entre outras. A combinação entre óleos (blend) pode gerar um produto mais completo pelo sinergismo entre seus componentes, como também pode ocorrer um efeito oposto onde um determinado óleo pode gerar efeito deletério a outro.

Tabela 2: Diferença em relação ao tratamento controle na manipulação da fermentação ruminal (mmol) em dietas de bovinos de corte

Óleos	Teste	Dosagem	Substrato	AGV	C <sub>3</sub>	pH	CH <sub>4t</sub>	CH <sub>4</sub> kg/MS	DMS(%)	Comentários	Referências
Blend 1	<i>in vivo</i>	1g/d e 2g/d	100% V	=	=	=	=	=	NA	Não alterou o CMS e as população de metanogênicas	Tomkins (2015)
Cravo	<i>in vitro</i>	0,25; 0,50 e 1g/L	50% V 50% C	-	-	+	-	NA	-	Reduziu a metanogênese e a produção de amônia	Patra & Yu (2012)
Eucalipto	<i>in vitro</i>	0,25; 0,50 e 1g/L	50% V 50% C	+	-	+	-	NA	-	Reduziu a metanogênese e a produção de amônia	Patra & Yu (2012)
Alho	<i>in vitro</i>	0,25; 0,50 e 1g/L	50% V 50% C	=	+	+	-	NA	=	Reduziu a metanogênese e a produção de amônia	Patra & Yu (2012)
Orégano	<i>in vitro</i>	0,25; 0,50 e 1g/L	50% V 50% C	-	-	+	-	NA	-	Reduziu a metanogênese e a produção de amônia	Patra & Yu (2012)
Pimenta	<i>in vitro</i>	0,25; 0,50 e 1g/L	50% V 50% C	=	-	+	-	NA	-	Reduziu a metanogênese e a produção de amônia	Patra & Yu (2012)
Blend 1	<i>in vivo</i>	1d/d	75 % V 25% C	=	=	=	=	=	-	Não alterou o CMS e o ganho de peso	Beauchemn & McGinn (2006)
Canela	<i>in vivo</i>	0,4; 0,8 e 1.6 g/d	9% V 91% C	=	=	=	NA	NA	=	Na menor dose aumentou o CMS e a DMO	Yang (2010)
Blend 1	<i>in vivo</i>	1g/d	7,5% V 92,5% C	+	=	=	NA	NA	=	Não houve diferenças no desempenho e características de carcaça	Meyer (2009)
Blend 2	<i>in vivo</i>	1g/d	7,5% V 92,5% C	+	=	=	NA	NA	=	Não houve diferenças no desempenho e	Meyer (2009)

Tomilho	<i>in vivo</i>	0,5g/Kg/MS	30% V 70% C	=	+	=	NA	NA	=	características de carcaça Não alterou o CMS. Reduziu a população metanogênica e de protozoários	Khorrani (2015)
Canela	<i>in vivo</i>	0,5g/Kg/MS	30% V 70% C	=	+	=	NA	NA	=	Não alterou o CMS. Reduziu a população metanogênica e de protozoários	Khorrani (2015)
Baunilha	<i>in vitro</i>	1,52g/L	50% V 50% C	-	=	-	-	NA	-	Reduziu a produção de amônia	Patra (2013)

+ (Aumento significativo) – (redução significativa) = (Sem alterações) NA (Não avaliado). Blend 1: orégano, cravo, baunilha, guaco e laranja. Blend 2: Guaco, eucalipto, tangerina.

Tabela 3: Diferença em relação ao tratamento controle na manipulação da fermentação ruminal (mmol) em dietas de bovinos de leite

Óleos	Teste	Dosagem	Substrato	AGV	C <sub>3</sub>	pH	CH <sub>4</sub> t	CH <sub>4</sub> kg/MS	DMS(%)	Comentários	Referências
Crina	<i>In vivo</i>	2g dia	42:58	=	=	+	NA	NA	+	Melhor digestibilidade, aumento da produção de leite e alteração da composição do leite.	Benchaar et al. (2006)
Crina	<i>In vivo</i>	0,75 g dia	50:50	+	+	=	NA	NA	=	Não alterou a produção e a composição do leite	Benchaar et al. (2007)
Blend	<i>In vivo</i>	0,5 g dia	34:66	=	=	=	NA	NA	=	Não alterou a produção e a composição do leite	Tager e Krause (2011)
Blend	<i>In vivo</i>	10 g dia	34:66	=	=	=	NA	NA	=	Reduziu o CMS	Tager e Krause (2011)
Orégano	<i>In vivo</i>	0,25 g dia	58:42	=	=	=	-	-	=	Diminuiu a amônia e o N urinário	Hristov et al. (2014)
Orégano	<i>In vivo</i>	0,5 g dia	58:42	=	=	=	-	-	=	Diminuiu a amônia e o N urinário	Hristov et al. (2014)
Orégano	<i>In vivo</i>	0,75 g dia	58:42	=	=	=	-	-	=	Diminuiu a amônia e o N urinário	Hristov et al. (2014)

+ (Aumento significativo) – (redução significativa) = (Sem alterações) NA (Não avaliado). Blend: orégano, cravo, baunilha, guaco e laranja.

Tabela 4: Estatística descritiva de experimentos utilizando óleos essenciais com pequenos ruminantes, sua dose de compostos ativos (OE dose; g/kg MS da dieta) e as variáveis da fermentação ruminal (Adaptado de Khiaosa-ard & Zebeli, 2013)

Parâmetros	n	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
CMS (%)	20	1.54	0.727	1.02	2.94	1.21
pH	25	6.31	0.392	5.39	6.89	6.37
OE dose (MI)	25	0.152	0.1937	0.00	0.750	0.100



Metano mmol/100 mmol AGV	25	22.6	6.51	12.3	31.6	25.2
AGV mmol	25	102.6	12.14	81.0	126.2	97.3
Acetato (%)	25	58.0	7.61	47.0	69.8	57.9
Propionato (%)	25	28.0	8.55	16.7	42.4	23.8
Butirato (%)	25	10.4	2.86	6.20	17.5	10.7
Acetato:propionato	25	2.33	0.906	1.12	4.18	2.59
Amônia mg/dl	19	22.2	13.73	7.45	56.1	16.8
Protozoários 10 <sup>9</sup> /MI	9	4.39	1.039	2.69	5.37	4.78

CMS: consumo de matéria seca

Uma redução nos ácidos graxos voláteis pode ser justificada pela menor fermentação ruminal. É mais interessante do ponto de vista energético uma alteração na proporção dos AGV, com maior contribuição do propionato e menores perdas de energia via CH<sub>4</sub>. Um aumento na produção de AGV muitas vezes se dá pela degradação dos compostos dos óleos no rúmen. Os óleos de alho, tomilho e canela foram os que apresentaram os resultados mais promissores em bovinos de corte, sendo que o alho foi ainda capaz de aumentar o pH, algo interessante para dietas com alto teor de concentrado.

A redução da produção de CH<sub>4</sub> deve ser pela maior proporção de propionato e não pela redução da digestibilidade da matéria seca (DMS). Pela grande quantidade de óleos para se avaliar e visando experimentos com menores custos, existe maior disponibilidade de trabalhos com ensaios *in vitro*. Os óleos essenciais são capazes de alterar a fermentação ruminal, gerando produtos mais desejáveis para o animal, culminando em uma melhor eficiência alimentar e um menor impacto ambiental.

## 6- Uso de ionóforos em dietas para ruminantes

Os ionóforos são um tipo de antibiótico que, seletivamente, deprime ou inibe o crescimento de microrganismos do rúmen. Eles são produzidos por diversas linhagens de *Streptomyces*, e pelo menos 74 deles foram descobertos depois da lasalocida, em 1951 (Nicodemo, 2001). Dentre os mais de setenta ionóforos existentes, a monensina sódica tem sido o principal produto utilizado como aditivo alimentar para ruminantes (Schelling, 1984). A monensina sódica, atua sobre o crescimento de determinadas bactérias, de modo que os produtos gerados durante o metabolismo das bactérias beneficiadas proporcionam vantagens nutricionais, metabólicas e na performance do animal.

O aumento no potencial genético dos animais demanda dietas com maiores teores energéticos e protéicos, sendo que a adição de produtos capazes de controlar ou modificar o padrão de fermentação no rúmen é uma estratégia importante (Zeoula et al., 2008). Os ionóforos modificam a produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, por meio da diminuição da proporção molar de acetato:butirato, da produção de gás metano e do aumento na produção de propionato. Ionóforos reduzem a produção de metano no rúmen de forma indireta, por inibirem o crescimento de bactérias gram-positivas (Rangel et al., 2008).

O mecanismo de ação dos ionóforos sobre as bactérias ruminais está relacionado com fatores de resistência presentes na estrutura da parede celular, e esta é responsável por regular o balanço químico entre o meio interno e externo

da célula, sendo este equilíbrio mantido por um mecanismo chamado de bomba iônica (Gonçalves et al., 2014). A monensina sódica passa assim a fazer um controle da população bacteriana uma vez que as bactérias gram-negativas (produtoras de ácido propiônico) possuem uma membrana externa formada por proteínas, lipoproteínas e liposacarídeos de característica hidrofóbica. Como a monensina é extremamente hidrofóbica, a membrana externa das bactérias gram-negativas passa a servir de barreira para a ação do ionóforo (Salman, et al, 2006).

## **7- Experimento *in vitro* de produção de gás**

Experimentos *in vivo* são onerosos, dependem de um número grande de animais e de um determinado tempo para a sua execução. Hoje em dia, pelo fato das questões de bem estar animal os comitês de ética restringem determinadas avaliações, preservando os animais. Desta forma, experimentos *in vitro* podem ser uma solução mais rápida, barata e que permite avaliar um número grande de amostras. Dentre os processos de avaliação usados mundialmente na nutrição animal destaca-se os métodos *in vitro* de Tilley e Terry (1963) e o *in situ* (Ørskov *et al.*, 1980).

A técnica de produção de gás (Theodorou *et al.*, 1994) é uma metodologia *in vitro* capaz de determinar com precisão os parâmetros da fermentação ruminal. Essa técnica vem merecendo grande atenção por parte dos pesquisadores, nos últimos anos, devido, entre outras vantagens, ao fato de possibilitar o estudo da cinética de fermentação, preservar a amostra a cada coleta de dados e permitir a detecção das frações solúveis dos alimentos para a fermentação ruminal (Magalhães, 2006). Mauricio et al. (1999) fez uma adaptação da técnica de modo a aumentar o número de coletas do gás, facilitando o trabalho dos operadores, dando mais acurácia nos dados obtidos.

Outros métodos *in vitro* são baseados em mensurações gravimétricas que consideram o desaparecimento do substrato (componentes que podem ou não contribuir para a fermentação), enquanto a mensuração de gás se concentra no surgimento de produtos de fermentação (substâncias solúveis, mas não fermentáveis, não contribuem para a produção de gases). Essa diferença no princípio do método faz com que essa técnica apresente alta correlação com a digestibilidade *in vivo* (Moreira et al. 2008). As desvantagens dessa técnica são a pequena quantidade de substrato utilizado e a alta quantidade de reagentes necessária para sua execução.

No início das pesquisas com óleos essenciais os trabalhos eram feitos somente *in vitro*, pela alta quantidade de óleos disponíveis para serem testados. Sendo que a técnica cumulativa de produção de gás foi muito importante nessas avaliações. Posteriormente os óleos que apresentaram resultados positivos começaram a serem testados na nutrição animal, sendo alguns transformados em produtos comerciais.

## **8- Parâmetros sanguíneos**

A avaliação do perfil hematológico serve como ferramenta auxiliar para identificar o estado de saúde dos animais, portanto o perfil hematológico em ovinos pode ser usado para monitorar a adaptação metabólica e diagnosticar desequilíbrios metabólico-nutricionais. Os dados fornecidos pelo hemograma

são essenciais dentro da investigação das doenças hematológicas (Hendrix & Sirois, 2007).

As amostras sanguíneas podem ser coletadas com ou sem anticoagulante. Sem o anticoagulante, o sangue irá coagular e será formado um líquido sobrenadante denominado soro. Muitas análises podem ser realizadas tanto em soro quanto em plasma, porém para determinação em eritrócitos, o sangue deverá ser coletado com anticoagulante. Dentre os anticoagulantes mais utilizados estão o ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), a heparina e o citrato, sendo o EDTA considerado o melhor anticoagulante para determinação do hemograma.

Deve-se cuidar para não haver ruptura das células no momento da coleta, transporte ou processamento das amostras sanguíneas. Elementos presentes no interior das células podem interferir com inúmeras análises bioquímicas, podendo resultar em valores falsamente elevados (Grotto, 2009).

### **8.1 Albumina**

A albumina é a proteína presente em maior quantidade no soro. Sua síntese é feita no fígado e possui funções como a manutenção da osmolaridade plasmática, transporte de elementos na circulação sanguínea, controle do pH e é uma das reservas de proteínas no organismo. Nos casos de deficiência nutricional de proteínas, os níveis de albumina sérica são reduzidos (González et al., 2006).

### **8.2 Triglicerídeos**

Os triglicerídeos (TG) são encontrados em sementes de plantas, grãos de alguns cereais e na gordura animal. É a principal forma de armazenamento de gordura no tecido animal, são sintetizados principalmente no fígado, no tecido adiposo, na glândula mamária e no intestino delgado, porém a maioria das células possuem a capacidade de realizar sua síntese (Bruss, 2008). Assim como ocorre com o colesterol, verifica-se aumento dos níveis séricos de triglicerídeos no período absorptivo. Durante o processo de absorção dos lipídios nos enterócitos, parte dos ácidos graxos é reesterificada a triglicerídeos, que são incorporados nas lipoproteínas. Estas são liberadas na circulação linfática e, posteriormente, atingem a circulação sanguínea e são direcionadas aos tecidos periféricos (Kozloski, 2002). Os níveis séricos de triglicerídeos em ruminantes são baixos comparados aos não ruminantes, o que reflete a baixa capacidade de síntese hepática de triglicerídeos nos primeiros. Porém, após a ingestão de dietas com alta densidade energética, ocorre aumento da síntese hepática de ácidos graxos a partir das elevadas quantidades de acetato e propionato que chegam ao fígado, resultando em aumento da exportação de triglicerídeos na forma de VLDL (Bruss, 2008).

### **8.3 Proteínas Plasmáticas (PPT)**

A albumina, as globulinas e o fibrinogênio constituem as principais proteínas plasmáticas, e estão envolvidas em uma variedade de funções: manutenção da pressão osmótica, viscosidade do sangue, transporte de nutrientes, metabólitos, hormônios e produtos de excreção, regulação do pH sanguíneo, além da participação na coagulação sanguínea. O fígado é o principal órgão produtor dessas proteínas, sendo que a síntese está diretamente relacionada com o estado nutricional do animal (González et al., 2006). A

redução das proteínas totais no plasma está ligada a falhas hepáticas, transtornos renais e intestinais, hemorragias ou deficiência na nutrição. Dietas com menos de 10% de proteína causam diminuição dos níveis de proteína no sangue. Em estados de inanição, elevada proteína de reserva, especialmente do músculo e fígado, as proteínas são degradadas para servir de fonte de glicose, reduzindo as proteínas totais no plasma, havendo queda na osmolaridade plasmática e resultando em saída de líquidos da corrente circulatória para os tecidos. Por outro lado, há um aumento das proteínas totais quando ocorre desidratação (Gonzáles et al., 2006).

#### **8.4 Aspartato aminotransferase (AST)**

A enzima aspartato aminotransferase (AST) é encontrada principalmente no fígado, nos eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco (Santos et al., 2007). O significativo aumento da AST sérica sugere lesão hepática grave e difusa, especialmente quando associada à icterícia (Meyer et al., 1992). Em contrapartida, na bibliografia compilada ficou bem definida que ela, também, pode ser muito útil no diagnóstico de alterações neuromusculares dos animais (Kaneko, 2008).

#### **8.5 Glicose**

É a principal substância utilizada pelas células para formação de energia. Em ruminantes, a glicose é pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, sendo formada a partir de precursores como o ácido propiônico e glicerol. Portanto, o nível de glicose plasmático, nesta espécie, é o indicador menos expressivo para avaliar o status energético devido à insensibilidade da glicemia a mudanças nutricionais e à sua sensibilidade ao estresse. Entretanto ela pode ser útil em condições de déficit energético severo e em animais que não estão em gestação e lactação (Riccó, 2004).

#### **8.6 Ureia**

A ureia é a principal forma de excreção dos compostos nitrogenados dos organismos. Os níveis de ureia sofrem significativa influência do funcionamento renal, trato urinário e da dieta. Com relação à dieta, a quantidade de proteínas afeta diretamente os níveis de ureia, ocorrendo aumento em dietas com alta proteína e redução com baixa proteína. Dietas com baixos níveis de energia ou com proteínas de baixa qualidade nutricional favorecem o aumento das concentrações de ureia devido o catabolismo proteico (Fernandez et al., 2012).

#### **8.7 Glutamiltransferase (GGT)**

A enzima gama glutamiltransferase (GGT) ocorre em todas as células com exceção das células musculares. Sua atividade é alta nos rins e no fígado, mas somente a GGT de origem hepática é encontrada no plasma. O aumento da atividade desta enzima ocorre em afecções hepatobiliares com colestase (Meyer & Harvey, 2004).

#### **8.8 Fosfatase alcalina (ALT)**

A enzima fosfatase alcalina é amplamente distribuída no organismo e quando ocorre um distúrbio hepático detecta-se um aumento de sua atividade no soro em decorrência de colestase por obstrução dos canalículos biliares e distúrbios gastrointestinais podem estar associados à elevação da atividade sérica desta enzima (Kerr, 2003; Kaneko, 2008).

Portanto, o perfil sanguíneo é uma ferramenta útil no auxílio da avaliação do status nutricional dos animais, bem como no diagnóstico de problemas metabólicos. Entretanto para que este seja utilizado adequadamente é necessária a utilização de valores de referência, de variáveis de estudo conhecidas, além de equipamentos e métodos corretos e economicamente viáveis.

## **CAPÍTULO II<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo elaborado conforme as Normas da Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (Apêndice 5).

## Óleos essenciais como modificadores da fermentação ruminal em substituição a monensina sódica *in vitro*

### Resumo

Objetivou-se avaliar *in vitro* o uso dos compostos secundários de plantas presentes em óleos essenciais como moduladores da fermentação ruminal alternativos à monensina sódica. Os tratamentos utilizados foram: controle, monensina sódica, óleo de alho, óleo de canela, óleo de cravo, óleo de hortelã-pimenta, óleo de junípero, óleo de laranja amarga, e óleo de melaleuca. Utilizou-se a técnica *in vitro* de produção de gás, onde as coletas foram nos horários 4, 8, 12 e 24 horas após a incubação. A produção de gás foi alterada ( $P < 0,001$ ) para os tratamentos monensina, canela e cravo. Os tratamentos alho e canela foram capazes de reduzir a digestibilidade da matéria orgânica em 20 e 26% em relação ao tratamento controle. A redução da produção de metano em relação ao tratamento controle foi de: 54%, 76%, 90%, 72%, 32%, 60%, 44% e 47%; respectivamente para monensina, alho, canela, cravo, hortelã-pimenta, junípero, laranja amarga e melaleuca ( $P < 0,001$ ). A concentração de  $N-NH_3$  foi reduzida drasticamente ( $P < 0,001$ ) em relação ao tratamento controle e os óleos de cravo e hortelã-pimenta aumentaram o pH. Os óleos essenciais testados no experimento na dosagem de 1 ml/l de solução são eficientes na redução do metano e da amônia.

(Palavras chave: Amônia, extratos, metano, produção de gás, ruminantes)

### Abstract

The objective of this study to evaluate the effect of secondary plant compounds present in essential oils in replacement of monensin on *in vitro* ruminal fermentation parameters. It was adopted a completely randomized design with nine treatments and four replicates. The treatments were: control (CON), monensin (MON), garlic oil (ALH), cinnamon oil (CAN), clove oil (CRA), mint oil (HOR), juniper oil (JUN), bitter orange oil (LAR), and melaleuca oil (MEL). The *in vitro* gas technique was used to record total gas production at 4, 8, 12 and 24 h after incubation. MON, CAN and CRA increased gas production. Garlic and cinnamon were able to reduce the digestibility of organic matter in 20 and 26% in relation to the control treatment. Methane production reduced ( $P < 0.001$ ) in 54, 76, 90, 72, 32, 60, 44 and 47% for MON, ALH, CAN, CRA, HOR, JUN, LAR and MEL, respectively. The  $N-NH_3$  concentration was dramatically reduced ( $P < 0.001$ ) with all additives and CRA and HOR increased the pH. The essential oils tested in the experiment at the dosage of 1 ml / l of solution are efficient in the reduction of methane and ammonia.

(Keywords: Ammonia, extracts, gas production, methane, ruminants)

## INTRODUÇÃO

Os aditivos são amplamente utilizados para promover o desempenho e a saúde dos animais (Hristov et al., 2014). A monensina é o ionóforo mais difundido mundialmente, sendo seu uso permitido em países como Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia e Brasil, maiores produtores mundiais de carne e/ou leite (Dufield et al., 2008). No entanto, desde a proibição dos antibióticos em 2006 pela legislação da União Europeia, os estudos com compostos naturais como alternativas aos antibióticos aumentou consideravelmente (Wallace, 2004; Durmic e Blache, 2012).

Alguns compostos naturais, rotulados como seguros para humanos (FDA, 2004), são propostos como substitutos potenciais de antibióticos na alimentação de ruminantes (Khiaosa & Zebeli, 2013; Salem et al., 2012). Estes incluem metabólitos secundários como saponinas, taninos e outros presentes em óleos essenciais (Calsamiglia et al., 2007; Patra & Saxena, 2009).

Como a ingestão de alimentos é o principal fator que afeta o desempenho animal (Illius & Jessop, 1996), os extratos de plantas não devem ter efeitos prejudiciais na digestibilidade da matéria orgânica e na produção de ácidos graxos voláteis (Wallace, 2004). Isto depende das características químicas dos compostos secundários (Frutos et al., 2004; Salem et al., 2012), que são altamente variável entre as espécies de plantas (Kamalak et al., 2005).

Nos últimos anos diversos trabalhos vem sendo realizados para buscar um óleo essencial com características positivas para o aumento da produtividade, de forma sustentável. Os óleos essenciais têm atividade antimicrobiana (Benchaar & Greathead, 2011; Cieslak et al., 2013) afetando a população bacteriana, entre elas, as produtoras de amônia (Wallace, 2004) e as metanogênicas bem como os protozoários (Jouany & Morgavi, 2007). Assim, o uso de compostos secundários em doses adequadas pode resultar em múltiplos benefícios na fermentação ruminal (Benchaar & Greathead, 2011; Patra & Yu, 2013).

Os resultados sobre a atividade anti-metanogênica dos metabólitos secundários das plantas indicam o seu potencial para serem utilizados como aditivos na alimentação para reduzir a produção de metano, mas o mecanismo da sua ação necessita de uma investigação detalhada (Rira et al., 2015).

Desta forma, objetivou-se avaliar o uso dos compostos secundários de plantas presentes em óleos essenciais em substituição à monensina como modificadores da fermentação ruminal *in vitro*.



### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de ruminantes do Laboratório de Ensino Zootécnico Prof. Geraldo Veloso Nunes Vieira (LEZO), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (Theodorou et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (Maurício et al., 1999) usando transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba-SP). Foram utilizados 7 µl de MON e e 50 µl de óleos por 50 ml de solução. O líquido ruminal foi coletado de dois ovinos fistulados no rúmen, e o substrato utilizado foi uma dieta com relação volumoso:concentrado de 15:85% conforme recomendações do NRC (2007).

Os tratamentos utilizados foram: controle (CON; substrato+meio de fermentação), monensina sódica (MON; Sigma Aldrich M5273), óleo de alho (ALH) óleo de canela (CAN), óleo de cravo (CRA), óleo de hortelã-pimenta (HOR), óleo de junípero (JUN), óleo de laranja amarga (LAR) e óleo de melaleuca (MEL) (tabela 1 e 2).

**Tabela 1:** Origem, parte extraída e densidade dos óleos essenciais utilizados no experimento

Compostos	Origem	Parte extraída	Densidade (ml/g)
Alho	China	Rizoma	1,49
Canela	China	Casca	1,42
Cravo	Indonésia	Folhas	1,50
Hortelã-pimenta	EUA	Folhas	1,19
Junípero	Brasil	Folhas	1,17
Laranja amarga	Brasil	Folhas	1,14
Melaleuca	Austrália	Folhas	1,18

**Tabela 2:** Composição dos óleos essenciais utilizados no experimento

	ALH(%)	CAN(%)	CRA(%)	HOR(%)	JUN(%)	LAR(%)	MEL(%)
Sulfeto dialílico	6-8	-	-	-	-	-	-
Dissulfeto dialílico	30-45	-	-	-	-	-	-
Trissulfeto dialílico	30-36	-	-	-	-	-	-
Disulfeto alil metílico	4	-	-	-	-	-	-
Trissulfeto alil metílico	6-12	-	-	-	-	-	-
A-pipeno	-	1-2	-	-	40-48	-	-
Canfeno	-	<1	-	-	1-3	-	-
B-cariofileno	-	<1	<1-3	-	-	-	-
Benzoato de benzila	-	5-8	-	-	-	-	-
Cinamaldeído	-	80-85	-	-	-	-	-
Eugenol	-	<1	90-95	-	-	-	-
Acetato de eugenila	-	-	<1	-	-	-	-
A-humuleno	-	-	<1	-	-	-	-
Óxido de cariofileno	-	-	<1	-	-	-	-

Mentona	-	-	-	24-28	-	-	-
Neomentol	-	-	-	9-14	-	-	-
Pipeno	-	-	-	<1	-	2-5	3-5
Mentol	-	-	-	44-48	-	-	-
Isomentol	-	-	-	2-3	-	-	-
1,8-cineol	-	-	-	<1	2-8	-	1-2
Acetato de mentila	-	-	-	5-7	-	-	-
Sabineno	-	-	-	-	5-9	-	-
lilalo	-	-	-	-	<2	-	-
Elemeno	-	-	-	-	<3	-	-
Terpineol	-	-	-	-	<2	-	-
Careno	-	-	-	-	1-2	-	-
Terpinen 4-ol	-	-	-	-	2-4	-	32-37
Mirceno	-	-	-	-	1-2	2-4	-
Limoneno	-	-	-	-	-	85-92	3-5
Y-terpineol	-	-	-	-	-	<1	-
A-terpineno	-	-	-	-	-	-	10-15
Y-terpineno	-	-	-	-	-	-	20-25
Cimeno	-	-	-	-	-	-	6
Terpinoleno	-	-	-	-	-	-	4-6

O concentrado era composto por milho (80%), farelo de soja (18%), sal mineral (1%) e calcário (1%); e o volumoso utilizado foi o feno de tifton 85 (Tabela 3). Foram utilizados frascos de 125 ML incubados com 500 mg de substrato, 10 ML de líquido de rúmen e 40 ML de meio de cultura Menke (1979).

**Tabela 3:** Composição química dos alimentos utilizados

	Farelo de soja	Milho	Feno de Tifton	Dieta total
MS	87,91	88,96	95,41	90,02
MO	92,87	98,63	90,73	85,70
PB	52,85	8,17	12,90	14,30
EE	0,36	3,76	1,17	2,81
FDN	11,72	15,40	72,55	24,56
FDA	6,33	3,04	43,95	11,01
HEM	5,39	12,36	28,6	13,55
CEL	5,83	2,19	39,03	9,28
LIG	0,50	0,85	4,92	1,73
NDT	84,07	82,94	79,96	94,08

MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, EE: extrato etéreo, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, HEM: hemicelulose, CEL: celulose, LIG: lignina e NDT: nutrientes digestíveis totais.

A produção de gás foi coletada nos horários 4, 8, 12 e 24 horas após a incubação. Para a estimativa do volume, utilizou-se a equação de regressão:  $V = P \times HD \times 0.068004084$ , em que V= volume em ML, HD= *headspace* e P= pressão em psi (Peripolli et al., 2014). Amostras foram coletadas de todos tubos e acidificadas com solução de ácido sulfúrico (10%) determinação de nitrogênio amoniacal e acidificadas com solução de ácido metafosfórico para determinação de ácidos graxos voláteis, posteriormente foram congeladas a -20 °C.

Na abertura das tampas (tempo 24h) colocaram-se os frascos em imersão no gelo para cessar a fermentação e posteriormente transferiu-se o conteúdo dos frascos para cadinhos filtrantes nº 2 utilizando-se água destilada para retirada do resíduo remanescente no interior dos frascos e transferência final para os cadinhos filtrantes. Em seguida, os cadinhos filtrantes foram levados à estufa a 105°C por 24 horas e resfriados em dessecador e pesados. Posteriormente os cadinhos foram queimados a 450°C por 12 horas.

A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DMO) foi calculada por diferença entre a matéria orgânica (MO) incubada e a MO não digerida presente nos cadinhos. O pH foi determinado com um phmetro digital. O fator de partição (FP) foi determinado conforme Makkar (2004). A contagem de protozoários foi realizada conforme Dehority (2003). O nitrogênio amoniacal foi determinado pelo método da destilação com óxido de magnésio, usando solução receptora de ácido bórico e titulação com ácido clorídrico a 0,01N (AOC, 1995).

Todo o volume de gás produzido durante os intervalos de 4, 8, 12 e 24 horas de incubação foi coletado e transvazado a tubos de vacutainer de 20 MI sem aditivo, para análise das concentrações de metano. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters® Modelo e2695 e detector Waters 2414), coluna Aminex HPX-87H 300x7.8mm, fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol/L, volume de injeção: 20uL, tempo de corrida: 25min, fluxo: 0,6MI/min, temperatura: 45°C e detector: RID (índice de refração) 40°C. As áreas de pico dos gases foram determinadas automaticamente por integração. O volume do gás metano produzido no tempo x foi calculado de acordo com Tavendale et al. (2005):

Produção de CH<sub>4</sub> (MI/gMS) no tempo x = (CH<sub>4</sub>%(x) – CH<sub>4</sub>%(x-1))\*40/100 + CH<sub>4</sub>%(x)\* PG/100, onde tempo x = 4, 8, 12 e 24 horas de fermentação ; x-1 = tempo prévio; 40 = volume de espaço livre no frasco de fermentação em MI; PG = volume de gás produzido em MI.

As concentrações dos ácidos graxos voláteis – ácido acético (C<sub>2</sub>), ácido propiônico (C<sub>3</sub>) e ácido butírico (C<sub>4</sub>) - foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em cromatógrafo (Shimadzu® modelo 14-B) equipado com detector UV, pré-coluna e coluna (Aminex HPX-87H, BioRad®). O ácido sulfúrico foi utilizado como eluente na concentração de 0,01 molar, em uma taxa de fluxo de 0,6 MI/mim e em temperatura de operação de 50°C. A detecção do comprimento de onda foi ajustada a 210 nm. As concentrações dos ácidos graxos voláteis foram calculadas a partir de curvas de calibração usando padrões (Sigma®, grau analítico) nas concentrações de 0,1 a 2,5 g/L.

Para correção dos dados foi utilizado a metodologia de brancos específicos (Araújo, 2011). Os resultados da produção de gases foram ajustados ao modelo logístico bicompartimental logístico

bicompartimental para a estimativa dos seus parâmetros (Schofield et al., 1994):  $V(t) = (Vf1/(1+\exp(2-4*Kd1*(T-L1)))+(Vf2/(1+\exp(2-4*Kd2*(T-L2))))$ , em que  $V(t)$  é o volume acumulado no tempo  $t$  (MI/g MO);  $Vf1$ , o volume de gás máximo oriundo da fração de rápida digestão (CNF) (MI);  $Kd1$ , a taxa de degradação da fração de rápida digestão (CNF) (%/h);  $L1$ , a latência ou o tempo de colonização da fração de rápida digestão (CNF) (h);  $Vf2$ , o volume de gás máximo oriundo da fração de lenta degradação (B2) (MI);  $Kd2$ , a taxa de degradação da fração B2 (%/h);  $L2$ , a latência ou o tempo de colonização em horas da fração B2 (CNF) (h);  $T$ , o tempo de incubação (h). Os parâmetros do modelo foram estimados pelo método iterativo Marquardt inserido no procedimento NLIN do SAS.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 4 repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SAS (2001), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

## RESULTADOS

A produção de gás foi alterada ( $P < 0,001$ ) para os tratamentos MON, CAN e CRA, mostrando a capacidade desses óleos de alterar a cinética da fermentação ruminal pelos seus componentes (tabela 4). Houve diferenças significativas nos parâmetros de digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DMO), produção de metano e contagem de protozoários ( $P < 0,001$ ) em todos os tratamentos que receberam óleos essenciais.

**Tabela 4:** Efeito do uso de óleos essenciais em 24h de fermentação *in vitro*

Tratamentos	PG 24h	DMO 24h	FP	CH <sub>4</sub> (MI)	CH <sub>4</sub> % MO degradada	Contagem de protozoários x10 <sup>5</sup> /MI
CON	115,8 a <sup>1</sup>	62,78 a	5,41 c	9,44 a	34,98 a	3,81 a
MON	74,5 b	57,68 ab	6,55 c	4,38 bc	17,73 abc	2,62 bc
ALH	101,2 a	52,40 b	5,20 c	2,30 bc	10,20 bc	2,06 cd
CAN	50,1 c	49,91 b	9,85 ab	0,92 c	4,35 c	3,62 a
CRA	69 b	60,54 ab	8,76 ab	2,60 bc	9,64 bc	1,78 d
HOR	83 ab	56,43 ab	6,80 bc	6,44 ab	26,44 ab	2,72 bc
JUN	83,2 ab	53,50 ab	6,59 c	3,81 bc	17,03 abc	1,44 d
LAR	94,3 ab	61,89 ab	6,60 c	5,31 abc	20,17 abc	2,87 b
MEL	90,8 ab	63,24 ab	7,00 abc	4,98 abc	18,34 abc	1,62 d
Valor de P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
EPM	4,24	0,94	0,47	0,53	2,01	0,14

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade. PG 24h: Produção cumulativa de gás nas 24h, DMO 24h: digestibilidade da matéria orgânica nas 24h, FP: fator de partição.

Houve um efeito significativo dos tratamentos (tabela 5) no pH e teor de N-NH<sub>3</sub> (P<0,001), juntamente com alterações na concentração de ácidos graxos voláteis e na proporção molar de acetato, propionato e butirato (P<0,001).

**Tabela 5:** Parâmetros fermentativos do uso de óleos essenciais em 24h de fermentação *in vitro*

	pH	N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	AGV (mM)	Acetato (mol/100mol)	Propionato (mol/100mol)	Butirato (mol/100mol)	A:P
CON	6,47 c	35,24 a	57,27 ab	59,72 ab	23,16 cd	17,11 de	2,58 ab
MON	6,54 bc	23,87 c	49,93 bc	38,98 cd	35,37 ab	25,65 ab	1,10 cd
ALH	6,49 c	20,54 d	31,22 d	55,53 b	25,32 c	19,15 cd	2,20 b
CAN	6,61 bc	10,74 f	27,40 d	52,65 b	26,91 c	20,45 c	1,96 bc
CRA	6,96 ab	15,47 f	47,20 c	34,28 d	38,19 a	27,52 a	0,90 d
HOR	7,18 a	27,54 b	58,21 a	57,30 ab	24,61 c	18,09 cde	2,33 b
JUN	6,76 abc	23,52 c	54,51 abc	62,90 a	20,55 d	16,55 e	3,08 a
LAR	6,75 abc	27,89 b	52,00 abc	42,90 c	33,12 b	23,98 b	1,29 cd
MEL	6,79 abc	23,52 c	33,54 d	58,14 ab	23,81 cd	18,05 cde	2,44 ab
Valor de P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
EPM	0,04	1,14	2,65	2,47	1,49	0,98	0,18

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade

## DISCUSSÃO

Para os OE serem aplicados na indústria animal eles deveriam melhorar a digestibilidade do alimento ou melhorar a conversão alimentar dos animais, não somente terem por função reduzir a metanogênese. Os efeitos dos OE sobre a fermentação ruminal são desejáveis se aumentarem ou não alterarem a concentração de ácidos graxos voláteis (ou resultarem em mudança desfavorável na relação acetato:propionato), diminuírem a concentração de amônia e a produção de CH<sub>4</sub> (Bodas et al., 2012). Os tratamentos CAN e CRA reduziram em mais da metade a produção de gás cumulativa (PG) após 24h comparados ao tratamento CON. No experimento de Pawar (2014), com uma relação volumoso-concentrado 50:50%, a produção cumulativa de gás no período de 24 horas para o óleo de canela foi reduzida de forma quadrática (P<0,01) e o óleo de cravo reduziu a PG de forma linear (P < 0,01). Patra & Yu (2012) observaram que a PG foi reduzida de forma quadrática (P < 0,05) no tratamento com óleo de cravo

O presente estudo apresentou um resultado interessante em relação a DMO, visto que inúmeros trabalhos usando OE mostram significativa redução na digestibilidade do alimento (Cobellis et al., 2016; Pawar et al. 2012), o que é uma grande desvantagem do uso desse tipo de aditivo. Somente o ALH e CAN foram capazes de reduzir a DMO, aproximadamente em 20% e 26%, respectivamente. Esse resultado foi

semelhante ao trabalho de Roy et al. (2014) onde foram testados diferentes óleos essenciais e os óleos de alho e de canela também reduziram a DMO.

Vários autores reportaram um efeito significativo na redução do metano *in vitro* pelo uso dos OE. No presente trabalho a redução da produção de metano em relação ao tratamento controle foi de: 54%, 76%, 90%, 72%, 32%, 60%, 44% e 47% para MON, ALH, CAN, CRA, HOR, JUN, LAR, MEL, respectivamente. No trabalho *in vitro* de Cobellis et al. (2016) trabalhando com uma relação volumoso/concentrado de 50%:50% e uma dosagem de 1.124 MI/l de OE, o metano foi reduzido ( $P < 0,001$ ) em 91% para o tratamento que recebia óleo de canela e em 78% o tratamento que possuía óleo de alecrim, em relação ao tratamento controle. Joch et al. (2016) trabalhando com uma relação volumoso/concentrado de 70%:30% e uma dosagem de 1 MI/l de componentes de OE e 0,15 MI de solução de monensina verificaram que o metano foi reduzido ( $P < 0,001$ ) em 32% para eugenol, 29% para limoneno, 41% para a-pipeno e 27% para monensina. Pinski et al. (2016) testaram diferentes óleos essenciais (500mg/l), e observaram que somente os óleos de canela e alecrim foram capazes de reduzir a produção de metano *in vitro* ( $P = 0,02$ ).

Extratos naturais de plantas contêm uma ampla variedade de compostos com diferentes funções e mecanismos de ação. Esses compostos possuem ação semelhante aos ionóforos, atuando de forma específica de acordo com sua estrutura química, levando a uma melhoria nos processos benéficos da fermentação ruminal e redução dos processos ineficientes (Mellor, 2000). Compostos fenólicos (timol, eugenol, carvacrol) ou óleos essenciais com altas concentrações destes fenólicos como óleo de canela e seu componente principal cinamaldeído, óleo essencial de alho e seus derivados, em particular dissulfeto dialílico e outros óleos essenciais podem ser eficazes *in vitro* na diminuição da produção de  $CH_4$  (Benchaar & Greathead, 2011).

Os OE podem afetar a metanogênese ao inibir o crescimento, o desenvolvimento e a atividade da população das bactérias metanogênicas, tanto diretamente, afetando a metanogênese quanto indiretamente, reduzindo o número de protozoários associados às bactérias metanogênicas (Cieslak et al., 2013). A redução na população de protozoários é dependente da dosagem dos OE avaliados (Patra et al., 2017). A redução na contagem de protozoários em relação ao tratamento controle foi de: 31%, 46%, 62%, 53%, 29%, 5%, 25% e 57%, para MON, ALH, CAN, CRA, HOR, JUN, LAR, MEL, respectivamente. No trabalho de Fandiño et al. (2008) ocorreu redução ( $P < 0,05$ ) no total de protozoários nos tratamentos que possuíam óleo de anis e monensina. Os mecanismos de ação dos OE em relação aos protozoários ainda não está bem

compreendido, mas segundo Cardozo et al. (2006) pode haver uma relação com sua natureza lipofílica que pode permitir que eles atravessem a membrana celular dos protozoários. Lin et al. (2013) demonstraram que a população de protozoários e de bactérias metanogênicas declinou após a adição de qualquer OE ou a mistura de seus componentes.

Segundo Cardozo (2005) os óleos essenciais são dependentes do pH para apresentarem o seu potencial. Desta forma, dietas com baixo pH (5,5), quando comparadas a um alto pH (7,0) são capazes de aumentar a concentração de ácidos graxos voláteis (principalmente propionato) e reduzir a quantidade de amônia, concordando com Spanghero et al. (2008) que observaram que em dietas que promovem a redução do pH os OE são mais eficientes em alterar a concentração molar dos AGVs.

Os óleos de CRA e HOR aumentaram o pH, algo que pode ser interessante quando se usa dieta com alto teor de concentrado, pelo fato de reduzir problemas metabólicos, como a acidose láctica e a laminite. Os OE testados por Patra & Yu (2012) aumentaram o pH de forma linear ( $P < 0,01$ ). No trabalho de Yadeghari et al. (2015) utilizando o óleo essencial de lavanda, ocorreu uma redução do pH em todas as doses incluídas ( $p < 0,05$ ), não apresentando efeito protetor contra a acidose ruminal. Contudo, nesse mesmo trabalho o uso da virginiamicina como controle positivo resultou em um controle eficiente da acidose. Jahani-Azizabadi et al. (2014) não encontraram diferenças significativas para o pH com a utilização de diferentes OE em diferentes níveis.

A concentração de  $N-NH_3$  foi reduzida drasticamente ( $P < 0,001$ ) em relação ao tratamento controle em: 48%, 72%, 228%, 128%, 28%, 50%, 26% e 50% para MON, ALH, CAN, CRA, HOR, JUN, LAR, MEL, respectivamente. Ferme et al. (2004) concluíram que o óleo de alho modificou o perfil da população microbiana *in vitro*, reduzindo a contribuição da *Prevotella* spp. Essa espécie é a principal responsável pela degradação de proteínas e desaminação de aminoácidos, sugerindo um mecanismo de ação do óleo de alho sobre o metabolismo proteico. Para Patra et al. (2012) a concentração de  $N-NH_3$  reduziu de forma linear para o óleo de cravo ( $P < 0,01$ ) e óleo de orégano ( $P < 0,05$ ), provavelmente pela inibição da desaminação de aminoácidos, uma premissa fundamentada pela reduzida proporção de AGV de cadeia ramificada (isobutirato e isovalerato).

A monensina geralmente reduz a degradação da amônia no rúmen, causando o seu acúmulo (Tedeschi et al., 2003). A produção de amônia foi semelhante para os tratamentos MON (23,87), JUN (23,52) e MEL (23,52). No geral, os ionóforos elevam a participação de bactérias gram-negativas no rúmen,

aumentam a proporção de propionato, reduzem as concentrações de acetato e butirato e da produção de metano (Rodrigues et al., 2007).

Os tratamentos HOR, JUN E LAR foram eficientes em aumentar a produção de AGV. Porém, um aumento na produção de AGV pode ser justificado pela degradação dos compostos dos óleos no rúmen. Os tratamentos CAN e MON apresentaram a menor relação acetato: propionato (A:P), esse fato deve ter ocorrido pela alta seletividade microbiana desses materiais. No experimento de Cobellis et al. (2016) com exceção do óleo de eucalipto, os óleos essenciais reduziram a produção de AGV e tiveram uma tendência a aumentar a relação A:P ( $P < 0,001$ ). Hundal et al. (2016) em um trabalho *in vitro* melhoraram a DMO e reduziram a relação A:P adicionando cinamaldeído e carvona ao substrato ( $P < 0,01$ ).

Segundo alguns estudos, os óleos têm a capacidade de reduzir a produção de metano, pelo fato da concorrência de substrato para a produção de propionato e a redução da metanogênese (Cieslak et al., 2013). Alterar o padrão fermentativo, reduzindo a relação  $C_2:C_3$ , torna o rúmen energeticamente mais eficiente e reduz a geração de  $CH_4$ . Ao se produzir propionato não há produção de  $H^+$  como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato. Além disso, as vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de  $H^+$  (Van Soest, 1994).

## CONCLUSÃO

Os óleos essenciais testados no experimento na dosagem de 1ml/l de solução são eficientes na redução do metano e da amônia, com exceção do alho e da canela não alteraram a digestibilidade da matéria orgânica. Experimentos *in vivo* são necessários para validar o uso desses compostos na indústria animal.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

## Referências

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Arlington, v. 2, 474p, 1995.
- ARAUJO, R C. et al. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology** 166–167: 155-162, 2011.
- BENCHAAR, C. & GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology** 166–167, 338–355, 2011.
- BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology** 176: 78-93, 2012.



- CALSAMIGLIA, S. et al. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation: a review. **Journal Dairy Science** 90:2580–2595, 2007.
- 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 Animal Science** 83, 2572–2579, 2005.
- CIEŚLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal** 7(2): 253–265, 2013.
- 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** 215: 25–36, 2016.
- DEHORITY, B.A. Rumen Microbiology. Thrumpton, Nottingham, Nottingham University Press, 372 p, 2003.
- DUFFIELD, T. F.; A. R. RABIEE; I. J. LEAN. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects. **Journal Dairy Science** 91:1347–1360, 2008.
- DURMIC, Z. & BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology** 176, 150–162, 2012.
- FANDIÑO, I. et al. Anise and capsicum as alternative to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n.1, p. 409–417, 2008.
- FDA. Food and Drug Administration of the US. Disponível em <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em Setembro de 2015.
- FERME, D. et al. The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. **Folia Microbiol.**, 49:151-5, 2004.
- FRUTOS, P. et al. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal Agriculture Research**. 2:191–202, 2004.
- ILLIUS, A. W. & JESSOP, N. S. Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants. **Journal of Animal Science** 74: 3052-3062, 1996.
- HRISTOV, A.N.; JOHNSON, K.A.; KEBREAB, E. Livestock methane emissions in the United States. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111:E1320, 2014.
- HUNDAL, J.S.; WADHWA, M.; BAKSHI, M.P.S. Effect of supplementing essential oils on the *in vitro* methane production and digestibility of wheat straw. **Journal of Animal Nutrition**. Vol.1 No.3:14, 2016.
- KAMALAK, A. et al. Chemical composition and its relationship to *in vitro* gas production of several tannin-containing trees and shrub leaves. **Asian-Aust. Journal Animal Science**.;18:203–208, 2005
- JAHANI-AZIZABADI H. et al. Effect of some plant essential oils on *in vitro* ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet. **Journal Agricultural Science Technology** 16, 1543- 1554, 2014
- JOCH, M. et al. *In vitro* screening of essential oil active compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation. **Asian Australasian Journal Animal Science** Vol. 29, No. 7: 952-959. 2016.
- JOUANY, J.P. & MORGAVI, D.P. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal** 1. p. 1443-1466, 2007.

- 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 Animal Science**. 91:1819–30, 2013.
- LIN, B. et al. Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. **Animal Feed Science and Technology** 184, 24–32, 2013.
- MAKKAR, H.P.S. Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. In: Assessing quality and safety of animal feeds. Rome: FAO **Animal Production and Health** Series 160. p.55-88, 2004.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology** v.79, p.321-330, 1999.
- MELLOR, S. Nutraceuticals – alternatives to antibiotics. **World Poultry** 16 (2): 30–33, 2000.
- MENKE, K.H et al. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **Journal Agriculture Science** (Cambridge), 92. p. 217-222, 1979.
- NRC. Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press, Washington D.C., 2007.
- PATRA, A.K. & SAXENA, J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutrition Research Reviews** 22:204–219, 2009.
- PATRA, A. K. & YU, Z. Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. **Applied Environmental Microbiology** 78, 4271–4280, 2012.
- PATRA A. K., YU Z. Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. **Bioresource Technology** 148 352–360, 2013.
- PATRA, A. K. et al. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 13, 2017.
- PAWAR M. M. et al. Effects of essential oil on *in vitro* methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor. **Agricultural Research** 3, 67–74, 2014.
- PERIPOLLI, V. et al. Models for gas production adjustment in ruminant diets containing crude glycerol. **Livestock Research for Rural Development** 26 (2), 2014.
- PINSKI, B.; GÜNAL, M.; ABUGHAZALEH, A. A. The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. **Animal Production Science**, v. 56, n. 10, p. 1707-1713, 2016.
- RIRA M. et al. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. International Conference on Technologies and Materials for Renewable Energy, Environment and Sustainability, TMREES15. **Energy Procedia** 74: 15–24, 2015.
- RODRIGUES, P.H.M. et al. Avaliação da monensina administrada pela forma convencional ou por dispositivo de liberação lenta (bólus) em bovinos alimentados com forragens de baixo valor nutritivo e suplementados ou não com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.1937-1944, 2007.

- ROY, D. et al. Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation *in vitro* using buffalo rumen liquor. **Veterinary World** 7, 213–218, 2014.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal Animal Science** v.72, p.2980-2991, 1994.
- SPANGHERO, M. et al. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** 153(1–2):153-157, 2009.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. System for Microsoft Windows: release 8.2. Cary. 1 CD-ROM, 2001.
- SALEM, A,Z,M. et al. Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifies *in vitro* gas production of other tree leaves. **Animal Feed Science and Technology** 176, 94–101, 2012.
- SHAHIN, Y. et al. Evaluating *in vitro* dose-response effects of *Lavandula officinalis* essential oil on rumen fermentation characteristics, methane production and ruminal acidosis. **Veterinary Research Forum**. 6 (4) 285 – 293, 2015.
- TAVENDALE, M.H. et al. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science and Technology** 123:403–419, 2005.
- THEODOROU, M.K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology** 48(1):185-197, 1994.
- TEDESCHI, L. O.; FOX, D.G.; TYLUTKI, T.P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal Environmental Quality** 32:1591–1602, 2003.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. New York: Cornell University Press. 476p, 1994.
- WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. of Nutr. Soc.*, 63:621-629, 2004.

## **CAPÍTULO III<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo elaborado conforme as Normas da Animal Feed Science and Technology (Apêndice 6).

## **Extratos de plantas como modificadores da fermentação ruminal de ovinos recebendo dietas com alto teor de concentrado**

Resumo: Objetivou-se avaliar o uso de extratos de plantas como moduladores da fermentação ruminal e suas alterações na resposta produtiva em cordeiros confinados recebendo dieta com alto teor de concentrado. Os animais foram divididos em 4 tratamentos: Controle (CON), Óleo de Cártamo (CAR), Óleo de Borragem (BOR) e Óleo de Gergelim (GER). Foram usados 16 ovinos machos Ile de France, castrados, com cinco meses de idade e peso vivo médio inicial de  $21,68 \pm 2,00$  kg. Cada animal recebeu 1 ml/dia de óleo. Os parâmetros de ganho médio diário (GMD) não foram alterados, tendo como média para os tratamentos que ganhavam óleo um ganho de 198g/dia ( $P=0,96$ ). Houve alteração no consumo de nutrientes ( $P=0,03$ ), sendo que o tratamento BOR apresentou maior consumo de matéria seca, proteína, fibra e energia em relação ao tratamento CON. A produção de metano/animal/dia em gramas foi reduzida ( $P=0,01$ ) em 23% em relação ao tratamento CON no tratamento que recebeu GER, e com uma tendência de redução nos outros tratamentos que recebiam o óleo, principalmente no tratamento CAR. Ocorreram diferenças significativas no comportamento ingestivo para os períodos, nos parâmetros de alimentação, tempo de mastigação total e ócio ( $P<0,001$ ). O BOR adicionado a uma dieta de alto concentrado para ovinos foi capaz de aumentar o consumo de matéria seca em 5%. O GER foi capaz de reduzir em 23% a produção diária de metano, sem afetar o desempenho, a digestibilidade, os parâmetros fermentativos e o comportamento dos animais.

Palavras chave: Comportamento, desempenho, extratos, metano, ruminantes

Abstract- The objective of this study was to evaluate the use of plants extracts as modulators of ruminal fermentation and its changes in the productive response for confined lambs receiving a high concentrate diet. The animals were divided in four treatments: Control (CON), Caramel Oil (CAR), Borage Oil (BOR) and Sesame Oil (GER). Sixteen male Ile de France sheep, castrated, with five months of age and average initial live weight of  $21.68 \pm 2.00$  kg were used. Each animal received 1 ml / day of oil. The average daily gain (GMD) parameters were not statistically altered, with a gain of 198 g / day ( $P = 0.96$ ) as the mean for treatments receiving oil. There was a change in nutrient intake ( $P = 0.03$ ), and the BOR treatment showed higher

consumption of dry matter, protein, fiber and energy in relation to the CON treatment. Emissions in other additives showed a tendency of reduction, especially CAR. Total chewing time and leisure time differed between periods ( $P < 0.001$ ). In vitro incubation of 1MI of essential oils were efficient in reducing methane and ammonia without altering OM digestibility. There were significant differences in the ingestive behavior for the periods, in the feeding parameters, total chewing time and leisure time ( $P < 0.001$ ). BOR added to a high concentrate diet for sheep was able to increase dry matter intake by 5%. GER was able to reduce daily production of methane by 23%, without altering the performance, digestibility, fermentative parameters of the animals and animal behavior.

Key words: behavior, extracts, methane, performance, ruminants

### **Introdução**

A fermentação entérica de alimentos é conhecida como a principal fonte de metano antropogênico e, portanto, como um grande contribuinte para o aquecimento global (IPCC, 2007; Gerber et al., 2013). Também representa ineficiência energética no metabolismo dos ruminantes (Johnson & Johnson, 1995). Os aditivos alimentares devem auxiliar na redução da síntese de metano, degradação ruminal da proteína e excreção de nitrogênio, promovendo a produção de ácidos graxos voláteis, síntese de proteínas microbianas e digestão de fibras (Nagaraja et al., 1997).

Os antibióticos têm sido amplamente utilizados para esses fins em ruminantes há bastante tempo. No entanto, o aparecimento potencial de resíduos em produtos de origem animal criou uma preocupação social sobre a transferência para humanos da resistência ao tratamento antibiótico observada em bactérias ruminais (Hart et al., 2008). Os extratos de plantas podem afetar uma ampla gama de microrganismos do rúmen (Wallace, 2004; Hart et al., 2008), incluindo bactérias gram-positivas (a maioria produtoras de acetato e butirato), gram-negativas (normalmente produtoras de propionato), metanogênicas, fúngicas e protozoários (Jouany & Morgavi, 2007, Patra e Saxena, 2009, Cieslak et al., 2013). Como consequência, podem modular a fermentação (Frutos et al., 2004, Busquets et al., 2006), reduzir a síntese de metano (Kim et al., 2013), e promover o crescimento de animais quando usado em doses adequadas (Durmic e Blache, 2012).

Um número considerável de estudos mostraram o potencial dos compostos de plantas para modificar a fermentação ruminal. Apesar das evidências convincentes, não há informação suficiente para suportar estes compostos como aditivos sob condições práticas (Bodas et al., 2012). Muitos estudos basearam-se na análise *in vitro* através de fermentadores ruminais, desta forma é necessária uma maior investigação *in vivo* para validar a eficiência dos compostos secundários de plantas (Rochfort, 2008). Portanto, existe uma grande necessidade do estudo de aditivos alimentares alternativos que possam ser empregados nas condições brasileiras de produção e que auxiliem na minimização de distúrbios digestivos que dietas de alto concentrado podem causar (Gomes et al., 2011).

Assim, objetivou-se avaliar os extratos de borragem (*Borago officinalis*), cártamo (*Carthamus tinctorius L.*) e gergelim (*Sesamum indicum L.*) como aditivos moduladores da fermentação ruminal e suas alterações na resposta produtiva, consumo, digestibilidade, comportamento ingestivo e produção de metano entérico para cordeiros confinados recebendo dieta com alto teor de concentrado.

## Material e métodos

### Localização

O experimento foi conduzido no setor de ruminantes do Laboratório de Ensino Zootécnico Prof. Geraldo Veloso Nunes Vieira (LEZO), pertencente ao Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre - RS. O trabalho foi realizado de 7 de maio até 6 de julho de 2016, em dois períodos experimentais de 23 dias cada, sendo que os 14 dias iniciais foram para adaptação dos animais aos tratamentos. Foram usados 16 ovinos machos Ile de France, castrados, com cinco meses de idade e peso vivo médio inicial de  $21,68 \pm 2,00$  kg.

Os animais foram alocados em baias individuais de madeira, suspensas do chão e dispunham de comedouros separados para o fornecimento de alimento e água. A temperatura e umidade relativa do ar foram mensuradas dentro do galpão, onde se localizava o experimento, com o auxílio de um termômetro digital de máximas e mínimas (Tabela 1).

Tabela 1: Dados de temperatura e umidade durante o experimento

	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Umidade máxima (%)	Umidade mínima (%)
Maio	18,78	12,58	97,28	74,68
Junho	15,49	8,01	95,20	68,97
Julho	22,41	12,66	97,86	65,57

#### Protocolo experimental

Os animais foram divididos em 4 tratamentos: T1- Controle (CON), T2- Extrato de Borragem (BOR, *Borago officinalis*), T3- Extrato de Cártamo (CAR, *Carthamus tinctorius L.*) e T4- Extrato de Gergelim (GER, *Sesamum indicum L.*). Para os animais dos tratamentos que receberam extratos foram administrados 1 MI por dia. Para os extratos de cártamo, borragem e gergelim, cada 1MI de tinha a densidade de 1,27; 1,30 e 1,30 gramas, respectivamente. Os extratos possuíam certificado de pureza, características físico químicas e de contagem microbiana.

A dieta (tabelas1 e 2) foi fornecida em duas refeições diárias, às 08:30 h e às 17:30 h, em comedouros individuais. A oferta permitia no mínimo 5% de sobras. O sal mineral e a água eram fornecidos *ad libitum*. O fornecimento de água foi realizado com o auxílio de bebedouros plásticos com capacidade para cinco litros. A oferta de água foi realizada duas vezes ao dia, juntamente com o fornecimento dos alimentos, pesando-se as ofertas e a sobras, com o auxílio de uma balança digital. A mensuração da oferta e da sobra de água foi realizada por massa (g), para evitar-se oscilações por variações na temperatura ambiente. Para controle da evaporação, foram utilizados baldes como “brancos da evaporação” dentro do galpão. A dieta foi formulada pelo Small Ruminant Nutrition System 81v.1.8.0 (Cannas et al., 2004) do National Research Council -NRC (2007) de modo a promover um ganho de 200g diário para cordeiros machos.

Tabela 2: Composição química dos ingredientes da dieta

Ingredientes	MS (%)	MO (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	HEM (%)	CEL (%)	LIG (%)	EB (kg/kcal)
Milho	87,11	98,93	8,87	33,24	2,17	31,07	0,72	1,45	4010,54
Farelo de soja	86,26	94,16	43,46	11,05	5,85	5,20	5,38	0,47	4116,33
Feno de alfafa	88,07	92,58	19,47	34,83	26,63	8,20	20,73	5,90	4127,84

MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, EE: extrato etéreo, FDN: fibra em detergente neutro, FDA: fibra em detergente ácido, HEM: hemicelulose, CEL: celulose, LIG: lignina e EB: energia bruta.



Tabela 3: Proporção dos ingredientes e composição química da dieta

Ingredientes	(%)
Milho grão	58
Farelo de soja	10,9
Feno de alfafa	30
Sal mineral <sup>1</sup>	1
Calcário	0,1
Composição química	(%)
Matéria seca	88,77
Matéria orgânica	94,67
Proteína bruta	16,52
Fibra em detergente neutro	30,98
Fibra em detergente ácido	13,52
Hemicelulose	17,46
Celulose	9,44
Lignina	4,08
Energia bruta (kcal/kg)	4110,02

<sup>1</sup>(Cálcio (Mín./Máx.): 180/200 g/kg; Fósforo (Mín.) 35 g/kg; Magnésio (Mín.) 12 g/kg; Sódio (Mín.) 100 g/kg; Enxofre (Mín.) 20 g/kg; Vitamina A (Mín.) 300.000 UI/kg; Vitamina D3 (Mín.) 60.000 UI/kg; Vitamina E (Mín.) 550 UI/kg; Niacina Protegida (Mín.) 40 mg/kg; Cobalto (Mín.) 40 mg/kg; Ferro (Mín.) 1.800 mg/kg; Iodo (Mín.) 60 mg/kg; Manganês (Mín.) 1.300 mg/kg; Selênio (Mín.) 10 mg/kg; Zinco (Mín.) 4.000 mg/kg).

O consumo foi avaliado diariamente, sendo que as sobras de alimento eram coletadas e pesadas na manhã do dia seguinte e guardadas em sacos plásticos individuais. O consumo máximo voluntário individual de cada nutriente avaliado foi obtido utilizando-se metodologia descrita por Prates (2007).

#### Ensaio de digestibilidade

A digestibilidade aparente foi avaliada através da oferta de 100% do consumo máximo voluntário apresentado pelo animal, dividida em duas refeições, por 6 dias consecutivos nos dois períodos experimentais, para todos animais. As sobras foram mantidas no comedouro e misturadas com a nova oferta de alimento, diariamente. As coletas de fezes iniciaram 48 horas após o início desta fase, com o auxílio de bolsas coletoras, internamente forradas com sacolas plásticas, trocadas diariamente, antes da alimentação matinal. Pesava-se todo o conteúdo da sacola e retirava-se uma amostra de 10% do peso total, armazenava-se em saco plástico individual e congelava-se, para formar uma amostra composta para posterior análise.

O pH fecal e escore fecal foram realizados semanalmente, durante todo período experimental. Para as fezes, foram utilizadas alíquotas de 20g de fezes frescas, acrescidas de 80ml de água deionizada. Após a homogeneização, foram filtradas em papel de filtro comum e

realizadas as leituras do pH fecal. O escore fecal foi classificado em uma escala de 1 até 6, onde: 1 – fezes ressecadas e sem brilho, 2 – fezes normais, 3 – fezes ligeiramente amolecidas, 4 – fezes amolecidas, perdendo o formato e coladas umas às outras, 5 – fezes amolecidas e sem o formato normal, 6 – fezes diarreicas.

#### Comportamento ingestivo

A avaliação do comportamento ingestivo foi realizada através da observação visual, sendo observados a cada cinco minutos, durante 24 horas subdivididas em três períodos de oito horas, para determinação do tempo despendido em ingestão, ruminação (em pé e deitado), e ócio (em pé e deitado), conforme metodologia citada por Johnson & Combs (1991). Durante a observação noturna dos animais, o ambiente foi mantido com iluminação artificial. O comportamento ingestivo foi avaliado em três dias distintos (02/06, 17/06 e 02/07/2016).

#### Avaliações de metano

Para quantificar a emissão de metano ( $\text{CH}_4$ ) utilizou-se da técnica descrita por Johnson et al. (1994) empregando o traçador hexafluoreto de enxofre ( $\text{SF}_6$ ). Para determinar a taxa de liberação dos tubos de permeação ( $\text{SF}_6 \text{ dia}^{-1}$ ) foi calibrado por aproximadamente cinco semanas. Os tubos foram administrados aos animais, via oral para alocação no rúmen, 10 dias antes de iniciar o período de coleta de gases. Para as coletas foram utilizados tubos de aço inoxidável para armazenamento dos gases, tubos esses previamente limpos com nitrogênio puro e esvaziados a vácuo. Um regulador de ingresso foi calibrado para coletar ar num período de cinco dias. Foram realizadas duas coletas, sendo uma em cada período experimental, em todos animais do experimento. Dentro do galpão foram colocados cinco tubos “brancos” para coleta do ar atmosférico, no intuito de corrigir os valores dos gases de interesse previamente existentes no ambiente. Após a coleta dos gases, realizou-se a medida de pressão dos tubos e cada amostra foi diluída com nitrogênio, para então se medir novamente a pressão final. As concentrações de  $\text{CH}_4$  e  $\text{SF}_6$  foram avaliadas por cromatografia gasosa. A curva padrão foi calibrada utilizando-se padrões nas seguintes concentrações: 30, 100 e 1000 ppt de  $\text{SF}_6$  e 5, 10 e 20 ppm de  $\text{CH}_4$ . Após as leituras, as concentrações de  $\text{CH}_4$  e  $\text{SF}_6$  foram corrigidas para diluição.

A partir da taxa conhecida de liberação do traçador no rúmen, das concentrações de

metano e do traçador nas amostras de gás medidas, o fluxo de metano liberado pelo animal foi calculado em relação ao fluxo de SF<sub>6</sub> da seguinte forma:  $QCH_4 = QSF_6 \times ((CH_4 - CH_4B) / (SF_6 - SF_6B))$ . Onde: QCH<sub>4</sub> é a taxa de emissão de metano em g dia<sup>-1</sup>; QSF<sub>6</sub> é a taxa de liberação do SF<sub>6</sub> da cápsula de permeação; CH<sub>4</sub> e SF<sub>6</sub> são as concentrações de CH<sub>4</sub> e SF<sub>6</sub>, respectivamente medidas no tubo de aço inoxidável e CH<sub>4</sub>B e SF<sub>6</sub>B são as concentrações de CH<sub>4</sub> e SF<sub>6</sub>, respectivamente medidas no tubo coletor “branco”. Para todas as análises de CH<sub>4</sub> foram utilizados dados individuais de cada animal.

#### Fermentação ruminal

As amostras de fluido ruminal foram coletadas 3 horas após a alimentação da manhã de todos os animais, a cada 2 semanas. As amostras de líquido ruminal foram obtidas usando uma sonda oroesofágica. Para evitar a contaminação com saliva a primeira amostra era desprezada e posteriormente com o auxílio de uma seringa foram coletados 80 ml de líquido ruminal. As amostras eram rapidamente filtradas, e determinado o pH através de um peagâmetro calibrado.

Posteriormente as amostras foram divididas em duas alíquotas, acidificadas e congeladas para a determinação de N-NH<sub>3</sub> e ácidos graxos voláteis. A concentração de N-NH<sub>3</sub> foi obtida pela destilação com óxido de magnésio, utilizando-se ácido bórico como solução receptora e ácido clorídrico 0,01N na titulação. As análises de ácidos graxos voláteis (AGV) foram realizadas no Instituto de Química – UFRGS. As concentrações dos AGV – ácido acético (C<sub>2</sub>), ácido propiônico (C<sub>3</sub>) e ácido butírico (C<sub>4</sub>) - foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em cromatógrafo (Shimadzu® modelo 14-B) equipado com detector UV, pré-coluna e coluna (Aminex HPX-87H, BioRad®). O ácido sulfúrico foi utilizado como eluente na concentração de 0,01 molar, em uma taxa de fluxo de 0,6 ml/min e em temperatura de operação de 50°C. A detecção do comprimento de onda foi ajustada a 210 nm. As concentrações dos ácidos graxos voláteis foram calculadas a partir de curvas de calibração usando padrões (Sigma®, grau analítico) nas concentrações de 0,1 a 2,5 g/L.

#### Parâmetros sanguíneos

As análises foram realizadas no laboratório de análises clínicas veterinárias - UFRGS. As colheitas de sangue foram realizadas no último dia de cada período experimental. As

amostras de 15 ml de sangue foram obtidas por venipuntura jugular, utilizando-se agulhas e seringas descartáveis e aliquotadas em frações de 3 ml de sangue, com anticoagulante fluoretado. Os 9 ml restantes sem anticoagulante foram utilizados para dosagem de glicose, e para obtenção do soro para posteriores análises bioquímico-séricas. A concentração de fibrinogênio foi determinada pelo método de precipitação pelo calor (Kaneko & Smith, 1967).

As amostras destinadas à dosagem de glicose foram centrifugadas imediatamente após as colheitas, e aquelas destinadas à obtenção do soro, até 30 minutos após a colheita, sendo submetidas a 5000 rpm durante 10 minutos e o soro sobrenadante recolhido em recipientes adequados, estocados e congelados à temperatura de -20°C. As leituras dos parâmetros bioquímicos foram realizadas em espectrofotômetro semi-automático (Labquest), com comprimento de onda específico para cada constituinte. O sangue coletado para a hemogasometria foi rapidamente inserido no cartucho (modelo CG4+, Abbott Park, IL, USA) o qual foi então introduzido no analisador sanguíneo portátil (i-STAT, Abbott Park, IL, USA) e, após alguns instantes, os resultados foram gerados. Foram analisados o pH sanguíneo, a pressão parcial de CO<sub>2</sub>, pressão parcial de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> total, bicarbonato, saturação de O<sub>2</sub> e lactato.

#### Produção de gás *in vitro*

Utilizou-se a técnica *in vitro* de produção de gás (Theodorou et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (Maurício et al., 1999) através do uso de um manômetro a pressão. Foram utilizados 50 µl de óleos por 50 ml de solução. O líquido ruminal foi coletado de dois ovinos fistulados no rúmen, e o substrato utilizado foi o mesmo do experimento *in vivo*. Foram utilizados frascos de 125 ml incubados com 500 mg de substrato, 10 ml de líquido de rúmen e 40 ml de meio de cultura Menke (1979). A produção de gás foi coletada nos horários 2,4, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a incubação. Na abertura das tampas colocaram-se os frascos em imersão no gelo para cessar a fermentação e posteriormente transferiu-se o conteúdo dos frascos para cadinhos filtrantes nº 2 utilizando-se água destilada para retirada do resíduo remanescente no interior dos frascos e transferência final para os cadinhos filtrantes. Em seguida, os cadinhos filtrantes foram levados à estufa a 105°C por 24 horas e resfriados em dessecador e pesados. Posteriormente os cadinhos foram queimados a 450°C por 12 horas. A digestibilidade verdadeira da matéria orgânica (DMO) foi calculada por diferença entre a matéria orgânica (MO) incubada

e a MO não digerida presente nos cadinhos. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 6 repetições. Os resultados da produção de gases foram ajustados ao modelo logístico bicompartimental logístico bicompartimental para a estimativa dos seus parâmetros (Schofield et al., 1994):  $V(t) = (Vf1/(1+\exp(2-4*Kd1*(T-L1)))+(Vf2/(1+\exp(2-4*Kd2*(T-L2))))$ , em que  $V(t)$  é o volume acumulado no tempo  $t$  (MI/g MO);  $Vf1$ , o volume de gás máximo oriundo da fração de rápida digestão (CNF) (MI);  $Kd1$ , a taxa de degradação da fração de rápida digestão (CNF) (%/h);  $L1$ , a latência ou o tempo de colonização da fração de rápida digestão (CNF) (h);  $Vf2$ , o volume de gás máximo oriundo da fração de lenta degradação (B2) (MI);  $Kd2$ , a taxa de degradação da fração B2 (%/h);  $L2$ , a latência ou o tempo de colonização em horas da fração B2 (CNF) (h);  $T$ , o tempo de incubação (h). Os parâmetros do modelo foram estimados pelo método iterativo Marquardt inserido no procedimento NLIN do SAS. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* SAS (2001), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

#### Análises químicas

Todas as amostras de alimento passaram por processo de pré-secagem em estufa de ar forçado a 60°C e, posteriormente moídas em moinho tipo Wiley com a utilização de uma peneira com crivos de 1mm de diâmetro. A matéria seca das amostras foi obtida após a sua pré-secagem e a moagem. As mesmas foram colocadas em estufa de ar forçado a 105°C até apresentarem peso constante. A determinação do conteúdo de cinzas das amostras foi obtida após 5 horas de incineração em mufla em 550°C. A matéria orgânica foi determinada pela diferença dos percentuais da matéria seca e do seu conteúdo de cinzas ( $MO = 100 - \text{cinzas}$ ). O teor de nitrogênio total das amostras, foi obtido através do método Micro-Kjeldahl conforme descrito por Prates (2007). Para obtenção do teor de proteína bruta, multiplicou-se o percentual de nitrogênio total pela constante de 6,25. Os teores de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram obtidos segundo metodologia descrita por Prates (2007). A energia bruta (kcal/g) foi obtida através do uso de bomba calorimétrica adiabática.

Os cálculos de consumo de matéria seca (CMS) e a digestibilidade de nutrientes (DN) foi realizado conforme as equações:

$$\text{CMS} = \frac{\text{matéria seca ingerida} - \text{matéria seca das fezes} \times 100}{\text{matéria seca ingerida}}$$

$$\text{DN} = \frac{\text{nutriente ingerido} - \text{nutriente das fezes} \times 100}{\text{nutriente ingerido}}$$

#### Análises estatísticas

Para análise estatística dos dados, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e três repetições. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento GLM e MIXED do pacote estatístico SAS (2001), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### Resultados

A inclusão dos óleos de borragem (BOR), cártamo (CAR) e gergelim (GER) não alteraram os parâmetros de ganho médio diário (GMD) (Tabela 4), tendo como média para os tratamentos que receberam óleo de 198g/dia (P=0,96) e o ganho total (GT) médio para os animais que receberam óleo de 12,07 kg (P=0,96) durante os 60 dias de experimento (Figura 1). A conversão alimentar (CA) (P=0,90) e a eficiência alimentar (EA) (P=0,88) não foram afetadas pelos tratamentos, porém a CA foi numericamente menor no tratamento GER.

Tabela 4: Desempenho de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

	CON	BOR	CAR	GER	EPM	Valor de P
Peso inicial (kg)	21,70	22,17	21,10	21,72	0,61	0,95
Peso final (kg)	33,82	34,67	32,92	33,62	0,63	0,84
Ganho total (kg)	12,12	12,50	11,82	11,90	0,46	0,96
Ganho médio diário (kg)	0,199	0,205	0,194	0,195	0,007	0,96
Condição corporal inicial	2,65	2,50	2,57	2,57	0,03	0,52
Condição corporal final	3,75	3,74	3,64	3,71	0,03	0,62
Conversão alimentar (kg)	5,33	5,48	5,21	5,10	0,17	0,90
Eficiência alimentar (%)	18,87	18,50	19,91	19,88	0,71	0,88

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim

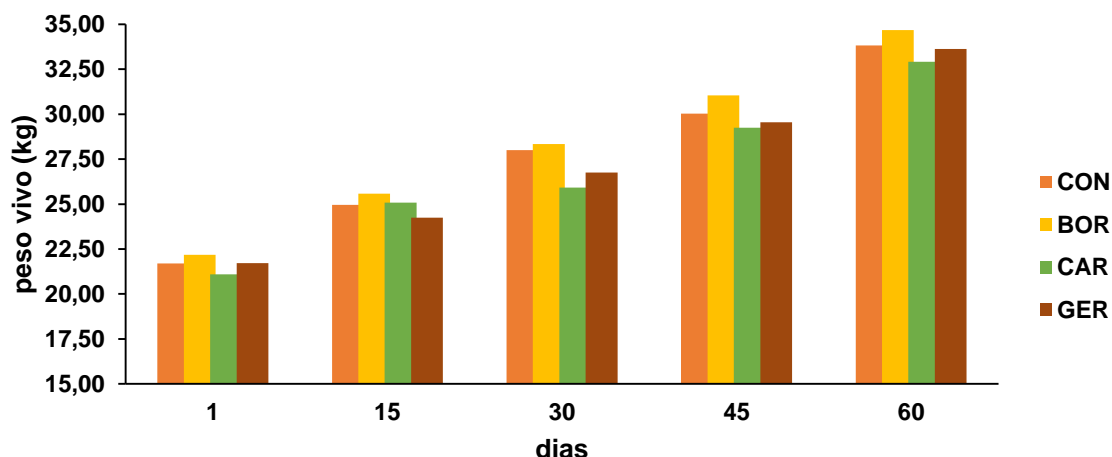


Figura 1: Evolução do ganho de peso (kg) dos animais ao longo do experimento. CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. Médias comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade

O uso de extratos de plantas alteraram o consumo de nutrientes ( $P=0,03$ ) em ovinos recebendo uma dieta com alto teor de concentrado (Tabela 5). O tratamento BOR apresentou maior consumo de matéria seca, proteína, fibra e energia em relação ao tratamento CON enquanto que os tratamentos CAR e GER tiveram menor consumo de nutrientes em relação ao tratamento CON. Não ocorreram alterações significativas no consumo de água ( $P=0,86$ ). Houve redução no CMS na média dos primeiros 15 dias do experimento (Figura 2) para o tratamento CAR ( $P<0,01$ ), que não foi alterado na média dos 30 dias ( $P=0,39$ ), 45 dias ( $P=0,21$ ) e nos 60 dias de experimento ( $P=0,31$ ).

Tabela 5: Consumo de nutrientes de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

	CON	BOR	CAR	GER	EPM	Valor de P
CMS (g/dia)	1057 b	1108 a	972 c	979 c	20,7	0,03
CH <sub>2</sub> O (g/dia)	2256	2106	2282	2141	0,08	0,86
CMO (g/dia)	1049 a	1001 a	920 b	927 b	19,6	0,03
CPB (g/dia)	175 b	183 a	160 c	162 c	3,42	0,03
CFDN (g/dia)	326 b	337 a	291 c	293 c	7,26	0,03
CFDA (g/dia)	142 a	147 a	127 b	128 b	3,17	0,03
CEB (kcal/kg)	4346 b	4556 a	3994 c	4023 c	85,2	0,03

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. CMS: consumo de matéria seca, CH<sub>2</sub>O: consumo de água, CMO: consumo de matéria orgânica, CPB: consumo de proteína bruta, CEB: consumo de energia bruta

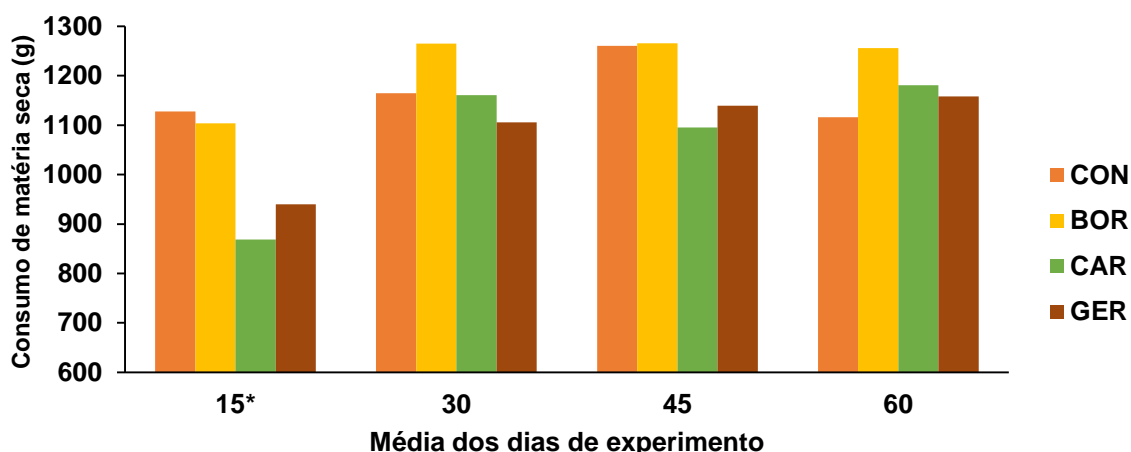


Figura 2: Evolução do consumo médio de matéria seca (g) dos dias 15, 30, 45 e 60 dias de experimento. CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. \* $P < 0,01$  pelo teste de tukey a 5% de probabilidade

A digestibilidade aparente da matéria seca (DMS) ( $P=0,17$ ) e dos nutrientes foi similar entre os tratamentos (Tabela 6). A DMS teve média de 81% e a digestibilidade da matéria orgânica 83% ( $P=0,69$ ). A digestibilidade da proteína bruta (DPB) teve média de 79% nos tratamentos que continham óleo versus 77% do tratamento CON ( $P=0,32$ ). Os escores fecais e seus valores ao longo do experimento (Figura 3) não foram alterados ( $P=0,29$ ), bem como o pH fecal ( $P=0,34$ ) dos ovinos.

Tabela 6: Digestibilidade aparente de nutrientes e parâmetros fecais de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

	CON	BOR	CAR	GER	EPM	Valor de P
DMS (%)	80,31	83,34	79,77	81,65	0,62	0,17
DMO (%)	81,73	84,56	81,12	83,10	0,69	0,31
DPB (%)	77,25	81,15	76,83	79,99	0,95	0,32
DFDN (%)	72,89	76,32	70,00	72,57	1,11	0,30
DFDA (%)	63,02	66,67	57,35	60,60	1,40	0,15
ED (%)	79,69	81,93	79,99	82,20	0,67	0,46
EF	3	3	3	3	0,11	0,29
pH fecal	7,72	7,74	7,92	7,85	0,04	0,34

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. DMS: digestibilidade da matéria seca, DMO: digestibilidade da matéria orgânica, DPB: digestibilidade da proteína bruta, ED: energia digestível, EF: escore fecal



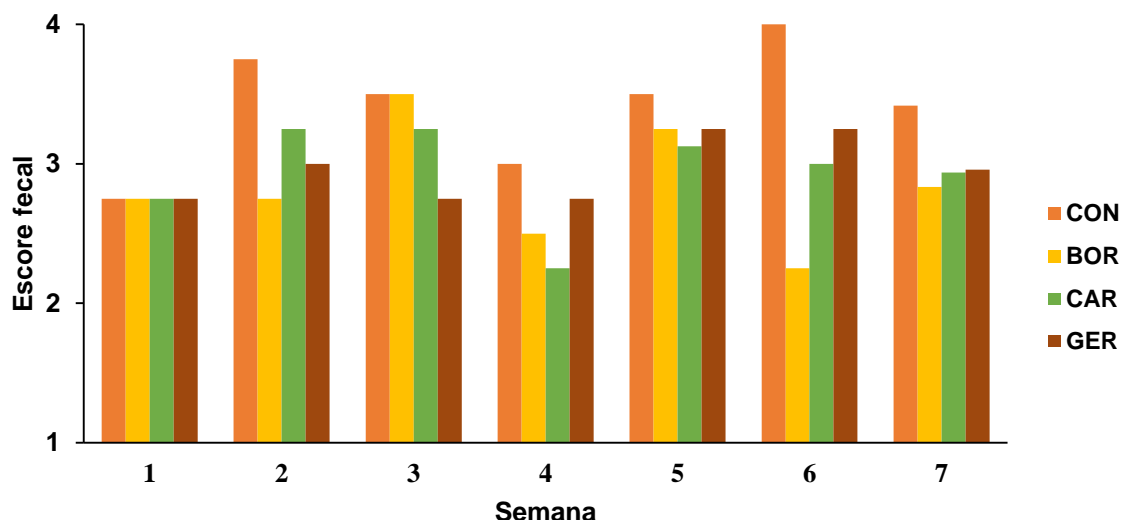


Figura 3: Evolução do escore fecal ao longo de 7 semanas de experimento. CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. Médias comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

A produção de metano/animal/dia em gramas (Tabela 7) foi reduzida ( $P=0,01$ ) em 23% em relação ao tratamento CON no tratamento que recebeu GER, e com uma tendência de redução nos outros tratamentos que recebiam o óleo, principalmente no tratamento CAR.

Tabela 7: Produção de metano de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

	CON	BOR	CAR	GER	EPM	Valor de P
g/animal/dia	26,80 a	26,43 ab	22,04 ab	21,85 b	0,79	0,01
g/kg de ganho de peso	135,23	131,80	117,50	113,57	5,33	0,43
g/kg MS ingerida	25,30	23,95	22,68	22,34	0,53	0,18
g/MS ingerida/PM <sup>0,75</sup>	0,19	0,18	0,17	0,17	0,004	0,18
g/kg MS digerida	31,55	28,75	28,37	27,45	0,76	0,26
% EB ingerida	8,12	7,69	7,28	7,17	0,17	0,18

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. PM: peso metabólico, EB: energia bruta. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

Os parâmetros ruminais dos ovinos recebendo extratos de plantas em uma dieta com alto teor de concentrado não foram alterados (Tabela 8). O pH teve média 6,22 ( $P=0,80$ ), o nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) teve média 11,92 mg/dL ( $P=0,86$ ) e os ácidos graxos voláteis (AGV) média de 99,02mM ( $P=0,75$ ). Os óleos não foram capazes de reduzir a relação acetato:propionato (A:P), visando um aumento na quantidade de propionato ( $P=0,09$ ).

Tabela 8: Parâmetros ruminiais de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

	CON	BOR	CAR	GER	EPM	Valor de P
pH ruminal	6,16	6,29	6,23	6,20	0,04	0,80
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	11,36	12,55	11,39	12,38	0,58	0,86
AGV (mM)	100,35	96,74	96,28	102,71	2,24	0,75
Acetato (mol/100mol)	56,08	54,11	58,81	58,65	0,87	0,17
Propionato (mol/100mol)	31,63	31,05	29,91	29,15	0,91	0,81
Butirato (mol/100mol)	14,84	13,23	12,28	12,20	0,44	0,08
A:P	1,79	1,76	1,99	2,10	0,09	0,57

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. A:P: relação acetato-propionato

Ocorreram diferenças significativas no comportamento ingestivo (Tabela 9) nos tempos destinados ao ócio deitado (P=0,02) e em pé (P=0,05), e nos diferentes períodos para os parâmetros de alimentação, tempo de mastigação total (TMT), ócio em pé (OP) e ócio deitado (OD) (P<0,001).

Tabela 9: Comportamento ingestivo (min/dia) de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

Parâmetros (min)	CON	BOR	CAR	GER	Tratamento	Período	TxP
A	144	145	140	139	0.95	<.0001	0.99
IA	6	4	4	7	0.48	0.06	0.57
TMT	430 a	427 a	432 a	389 b	0.08	<.0001	0.14
OD	722 a	702 ab	649 b	755 a	0.02	<.0001	0.87
OP	220 b	236 ab	288 a	220 b	0.05	<.0001	0.99
OU	62	71	67	69	0.62	0.02	0.77
RD	271	266	272	232	0.33	0.36	0.16
RP	15	16	19	19	0.15	0.79	0.54

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim. A: alimentação, IA: ingestão de água, TMT: tempo mastigação total, OD: ócio deitado, OP: ócio em pé, OU: outras atividades, RD: ruminando deitado e RP: ruminando em pé.

Dentre os parâmetros sanguíneos, de bioquímica sérica e hemogasometria houve diferença significativa apenas na ureia (P=0,01), sendo o maior teor no tratamento BOR e o menor no tratamento com (Tabela 10). Houve tendência de alterações nos tratamentos para os parâmetros: albumina (P=0,07), globulina (P=0,06), proteína total (P=0,06), TCO<sub>2</sub> (P=0,07) e fibrinogênio (P=0,09). Não houve interação entre tratamento e período para os parâmetros analisados.

Tabela 10: Parâmetros sanguíneos de ovinos recebendo extratos de plantas como aditivo

Parâmetros	CON	BOR	CAR	GER	Trat.	Per.	TxP
Albumina g/L	36,50	36,25	34,75	36,50	0.07	0.03	0.86
Globulina (g/dL)	31,12	33,88	26,87	30,37	0.06	0.02	0.27
Colesterol (mg/dL)	50,75	56,87	45,00	56,87	0.18	0.004	0.40
Triglicerídeos (mg/dL)	13,77	15,11	11,12	13,88	0.91	0.02	0.42
Proteína total (g/dL)	67,62	69,50	61,62	66,62	0.06	0.11	0.30
AST (UI/L)	87,00	90,37	90,12	94,00	0.97	0.07	0.51
Fos. Alcalina (UI/L)	398,00	454,13	518,38	451,88	0.54	0.01	0.84
Ureia (mg/dL)	40,00 b	55,87 a	43,12 b	40,50 b	0.01	0.38	0.25
Glicose (mg/dL)	73,87	74,37	76,37	72,50	0.70	0.002	0.60
pH	7,44	7,42	7,43	7,46	0.38	0.0002	0.52
pCO <sub>2</sub> (mm/Hg)	39,41	39,60	38,25	37,90	0.89	0.0003	0.68
pO <sub>2</sub> (mm/Hg)	37,87	33,25	33,87	40,62	0.19	0.001	0.94
EB (mEq/L)	3,29	2,25	2,71	3,67	0.42	0,27	0.72
HCO <sub>3</sub> (mM)	26,32	26,10	26,36	27,10	0.56	0.0004	0.46
TCO <sub>2</sub> (mM)	27,75	27,50	28,00	29,50	0.07	<0.0001	0.17
SO <sub>2</sub> (%)	64,62	65,25	66,12	72,62	0.48	<0.0001	0.63
Lactato (mM)	1,71	1,11	1,15	1,09	0.18	0.97	0.57
GGT (UI/L)	34,12	40,25	36,50	36,37	0.14	0.03	0.85
Fibrinogênio (mg/dL)	142,31	171,44	84,01	77,31	0.09	0.72	0.89

CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim.

Na Figura 4, são apresentadas as curvas de produção cumulativa de gases (PG) *in vitro* dos diferentes extratos de plantas avaliados, que refletem a degradação do material. Nota-se, graficamente, a superioridade do GER seguido pelos BOR, CAR e o tratamento CON.

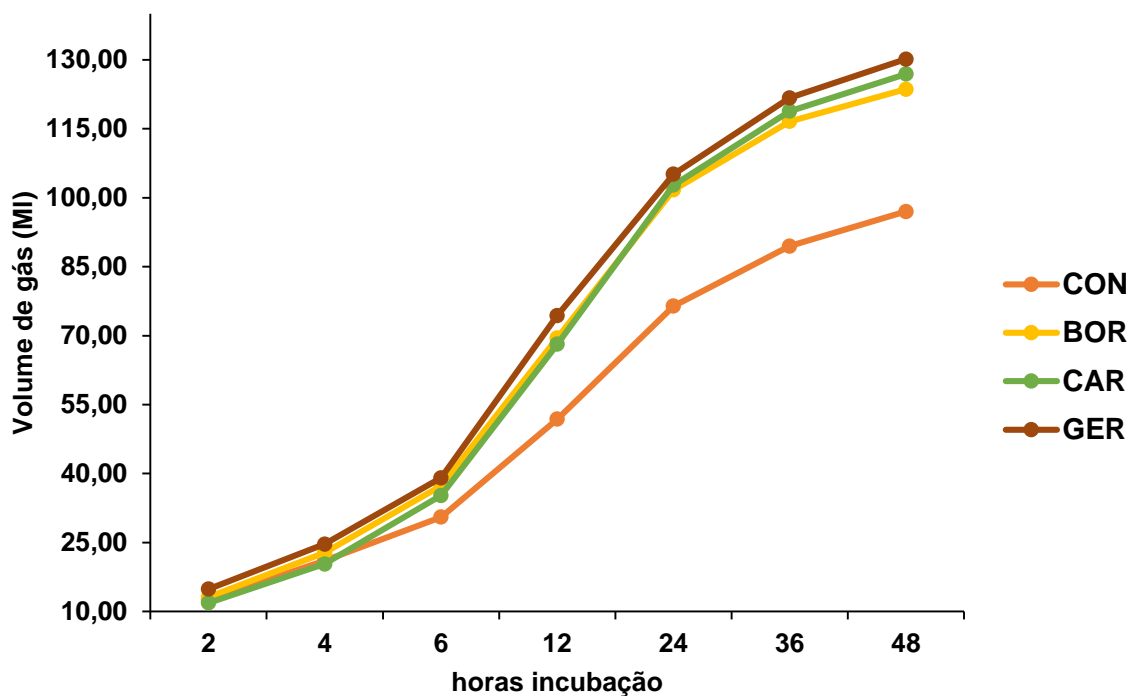


Figura 4: Produção cumulativa de gases dos diferentes extratos de plantas (MI). CON: controle, BOR: borragem, CAR: cártamo, GER: gergelim.

## Discussão

A falta de efeito no desempenho dos animais que receberam o óleo pode ser pela oferta irrestrita de alimento e pelo adequado balanceamento dos nutrientes da dieta, onde os animais expressam a máxima do seu crescimento biológico. Se fossem ofertados alimentos de menor qualidade poderiam ocorrer mudanças no desempenho dos animais. Mesmo não ocorrendo diferenças estatísticas ( $P=0,90$ ), a melhor CA foi no tratamento GER. Devido ao alto custo da dieta dos animais, principalmente em sistemas de produção mais intensivos, pode ser mais favorável do ponto de vista econômico animais que apresentem melhor CA do que ganho de peso final.

Chaves et al. (2011) não encontraram diferenças no desempenho de cordeiros recebendo diferentes níveis de cinamaldeído durante um período de 18 semanas, tendo um GMD de 237 g/dia ( $P=0,91$ ). Malekhhahi et al. (2015) também não verificaram alterações no desempenho de cordeiros recebendo uma dieta com alto teor de concentrado e sendo suplementados com uma mistura de óleos essenciais (timol, carvacrol, eugenol, limoneno e cinamaldeído). Khiaosa & Zebeli (2014) realizaram uma meta-análise e avaliaram 6 trabalhos com pequenos ruminantes em que os animais recebiam compostos de plantas, onde os animais tiveram um elevado GMD, tendo como média 265g/dia (desvio padrão=0,037).

O CMS dos tratamentos que recebiam óleo teve média de 1019 g/dia, versus 1057 g/dia dos animais do tratamento CON. Quando expressa em porcentagem do peso vivo, os animais do tratamento CON tiveram ingestão de 3,84% do peso vivo, e os tratamentos BOR, CAR e GER tiveram ingestão de 3,91%, 3,61% e 3,54% do peso vivo, respectivamente. O tratamento BOR sempre teve o maior CMS ao longo dos 60 dias de experimento, entretanto não refletiu em um maior GMD. Já os tratamentos CAR e GER tiveram um menor CMS no período inicial do experimento ( $P<0,01$ ), que foi ajustado no decorrer do experimento. A explicação para um menor CMS nesses tratamentos é que esses extratos aumentam os teores de leptina, gerando maior saciedade nos animais.

Entretanto, diversos autores avaliando extratos de plantas não encontraram diferenças significativas no consumo de nutrientes em vacas de leite (De Jesus et al. 2016; Vendramini et al. 2016) e ovinos (Chaves et al. 2011, Klevenhusen et al. 2011a, Malekhhahi et al. 2014).. A

adequada dosagem desses extratos pode ser responsável por não comprometer a ingestão de alimento.

Cardozo et al. (2006) foram capazes de aumentar o CMS de novilhas de corte recebendo uma dieta com alto teor de concentrado ao adicionar óleo de anis ( $P < 0,10$ ) e óleo de pimenta ( $P < 0,05$ ) na dieta. Da mesma forma, Prado-Rodriguez et al. (2011) tiveram uma resposta linear no CMS ( $P < 0,04$ ) de novilhas recebendo uma dieta total com 90% de concentrado ao adicionar extrato de pimenta.

Silva et al. (2016) testando diferentes extratos de plantas encontraram diferenças significativas no consumo de nutrientes. A explicação dos autores é que os compostos presentes nos extratos reduzem a velocidade de passagem do alimento pelo trato gastrointestinal, o que implica em maior taxa de degradação ruminal, pelo fato que as bactérias responsáveis pela degradação da celulose pertencem ao grupo gram-positivo. Klevenhusen et al. (2011b) melhoraram a digestibilidade da matéria orgânica e a eficiência de utilização da energia ao utilizar dialil dissulfeto na dieta. Cruz et al (2014) verificaram melhora na digestibilidade ( $P < 0,01$ ) da MS em 9% e da PB em 10%, ao adicionarem uma mistura de óleo de caju e mamona na quantidade de 3g/animal/dia para tourinhos confinados. No presente trabalho o tratamento BOR melhorou numericamente a DMS em 4% e a DPB em 5%. Os aditivos fitoquímicos são capazes de reduzir a degradabilidade da MS e PB pela inibição das bactérias envolvidas nesse processo, sendo um processo benéfico para o animal (Patra & Saxena, 2009). Os extratos de plantas são capazes também de estimular a produção de saliva e sucos gástricos e pancreáticos, favorecendo a secreção de enzimas, aumentando assim a digestibilidade (Mellor, 2000).

Aditivos em dietas para ruminantes têm sido usados visando melhorar a relação simbiótica entre os microrganismos presentes no rúmen e seu hospedeiro, melhorando os processos fermentativos no rúmen em animais que recebem dietas ricas em amido (Franzolin et al., 2000). O metano deve ser afetado por um efeito seletivo dos compostos secundários de plantas através da inibição direta das archaea metanogênicas e/ou depressão dos processos metabólicos microbianos envolvidos na metanogênese (Bodas et al, 2012). A redução desejada na produção de  $CH_4$ , ao se utilizar extratos naturais de plantas como aditivos, é frequentemente acompanhada por uma diminuição significativa no consumo, fermentação e digestão do alimento (Patra et al., 2017).

As pesquisas com compostos secundários de plantas *in vitro* foram bem aprofundadas pela ciência nos últimos anos, trazendo resultados satisfatórios em relação aos gases de efeito estufa. Porém, poucos trabalhos avaliaram *in vivo* o potencial de extratos de plantas como moduladores da metanogênese em ruminantes, sendo que os poucos que testaram não trouxeram resultados satisfatórios para esses compostos na forma de aditivo.

Klevenhusen et al. (2011a) avaliaram um componente do óleo de alho na dieta de ovinos em um período de 69 dias experimentais, não ocorrendo diferenças na produção de metano diária, tendo como média 28,6 g/metano/animal/dia ( $P=0,19$ ). Castro-Montoya et al. (2015) ofertaram 200 g de um produto comercial formado por óleos essenciais durante 6 semanas e não encontraram alterações na produção de metano diária para vacas ( $P=0,07$ ) e bovinos de corte (0,29). Meale et al. (2014) através de um quadrado latino com vacas de leite no período de 21 dias não encontraram diferenças para os animais que receberam óleo de alho ou óleo de zimbro ( $P=0,51$ ) na produção de metano e dióxido de carbono diário. Neste último trabalho, os autores relatam que as diferenças na produção de metano podem não ter ocorrido pelo número reduzido de animais nos experimentos e pela baixa dosagem ofertada dos óleos.

Entretanto, Wang et al. (2009) usando um óleo comercial a base de orégano na alimentação de ovinos fistulados conseguiram reduzir a produção de metano em 12% ( $P=0,003$ ), sendo que os animais produziram 17 g/animal/dia. Klevenhusen et al. (2011b) utilizando óleo de alho adicionados a uma dieta para ovinos reduziram em 10% a produção de metano em relação ao tratamento controle, com uma produção de 26 g/animal/dia. Ma et al. (2017) usando flavonoides reduziu a formação de metano ( $P<0,001$ ) em 12 %, pela inibição dos microrganismos relacionados a metanogênese, principalmente metanogênicos e protozoários.

O metano entérico é uma perda de energia produtiva na faixa entre 2% e 12% do CEB em ruminantes, dependendo do nível de ingestão de alimentos e da composição da dieta (Johnson & Johnson, 1995). Desta forma, nos tratamentos estudados os animais que receberam os óleos tiveram uma perda de metano média de 7,38% e o tratamento CON de 8,12% em relação ao CEB ( $P=0,18$ ). Acredita-se que os compostos bioativos presentes nos extratos de plantas ajam sobre as bactérias gram-positivas e protozoários, reduzindo a disponibilidade de  $H^+$  para a síntese de metano (Benchaar et al, 2008), disponibilizando mais energia para os animais.

A ingestão de dietas ricas em grãos pode levar a ocorrência de distúrbios no rúmen, pois favorece a rápida queda do pH ruminal, devido a altas taxas de digestão e produção de ácidos graxos voláteis (Owens & Goetsch, 1993). Desta forma, o uso de aditivos na dieta pode modular a fermentação ruminal de forma positiva ao animal. No presente estudo os extratos aumentaram numericamente o pH ruminal dos animais.

Ocorreu uma tendência de redução na concentração molar de butirato ( $P=0,08$ ) nos tratamentos que recebiam extrato. Esse fato é interessante visto que para a síntese de butirato é liberado  $H^+$  que serve de substrato para a produção de  $CH_4$ . Desta forma, redução na concentração de butirato pode aumentar a eficiência energética dos animais.

Chaves et al. (2008) utilizando carvacrol e cinamaldeído na dieta de ovinos foram capazes de aumentar o teor de AGV ( $P<0,01$ ), principalmente propionato. Prado-Rodriguez et al. (2011) observaram um efeito linear no total de AGV ( $P<0,08$ ) ao adicionar um extrato de pimenta. Cardozo et al. (2006) reduziram a relação A:P ao adicionar óleo de pimenta na dieta. Sahraei et al. (2014) ao adicionarem diferentes níveis de óleo de alecrim na dieta de ovinos encontraram efeito positivo na fermentação ruminal, porém em uma baixa dosagem o óleo apresentou efeitos adversos na fermentação ruminal. Malekkhahi et al. (2014) não encontraram alterações na produção de AGV para cordeiros recebendo diferentes extratos de plantas em uma dieta com alto teor de concentrado.

O propionato é absorvido no rúmen e transformado em glicose no fígado. A glicose é usada no tecido mamário e muscular para alcançar níveis de produção que somente com uma dieta a pasto se torna impossível de obter (Da Silva et al., 2016). A menor relação de acetato:propionato, a combinações de fatores como o aumento do consumo e a digestibilidade aparente da MS e fibra, a maior taxa de passagem das dietas com maior conteúdo de grãos se relaciona com menores emissões (McGeouch et al., 2010).

O fato de não ocorrer alterações no tempo de alimentação neste estudo foi interessante já que esses extratos modificam a aceitabilidade dos animais, conseqüentemente deprimindo o consumo. Porém os extratos utilizados no presente estudo não apresentaram odor acentuado e devido a baixa quantidade incluída na dieta, podem ser responsáveis por não alterarem o tempo médio de alimentação.

Silva et al. (2016) testaram diferentes extratos de plantas (alho, coentro, orégano e

algaroba) como aditivos fitogênicos na dietas de ovinos e não encontraram diferenças no comportamento ingestivo dos animais. No trabalho de Blanch et al.(2016) com vacas multíparas o uso de um aditivo comercial formado por cinamaldeído e óleo de alho, melhorou a produção de leite sem alterar o CMS e o tempo de alimentação diário. Em outro trabalho utilizando vacas de leite suplementadas com óleos essenciais não foram encontradas alterações no tempo de alimentação, ruminação e no CMS (Tagerand & Krause, 2011). Os trabalhos supracitados utilizaram produtos comerciais de compostos secundários microencapsulados, essa tecnologia acaba mascarando o odor desses óleos, reduzindo a chance de baixa aceitabilidade por parte dos animais.

O tempo em porcentagem da alimentação e ócio total foi: 30% e 65%, 30% e 65%, 30% e 65% e 27% e 68% para os tratamentos CON, BOR, CAR e GER respectivamente. A maior parte do ócio em pé foi no período diurno, já o ócio em deitado em sua totalidade foi no período noturno (entre 23h até as 6h). Não ocorreram diferenças significativas no tempo destinado a ruminação. Segundo Van Soest et al. (1991) o tempo de ruminação é influenciado pela natureza da dieta e parece ser proporcional ao teor de parede celular dos volumosos, desta forma uma dieta com alto teor de concentrado, o tempo destinado a atividade de ruminação é reduzido.

De acordo com Meyer & Harvey (2004) os valores de referência da ureia para ovinos estão entre 17 e 43 mg/dL. Desta forma o tratamento BOR apresentou 40% maior teor que o tratamento CON e 30% acima do valor máximo de referência. A ureia sanguínea tem correlação positiva com a concentração de amônia ruminal e com o uso de aminoácidos (alanina, glutamina e glicina) precursores gliconeogênicos no fígado (Kozloski, 2011). A amônia formada no rúmen quando não é capturada pelos microrganismos ruminais para a síntese proteica é absorvida por meio da parede ruminal e levada pela corrente sanguínea até o fígado, onde é convertida novamente em ureia por meio do processo conhecido como "ciclo da ureia" (Russel et al., 1992). Portanto, o maior teor de ureia no tratamento BOR é devido ao maior consumo de proteína pelos animais nesse tratamento.

A acidose láctica fica caracterizada quando o nível de lactato sanguíneo excede a 5 mmol/L. Os valores normais de lactato sanguíneo para as diferentes espécies, em geral, estão em torno de 1,2 mmol/L. Os valores de albumina não podem ser maiores que 38 g/L média=36 g/L), o pH sanguíneo não deve ser inferior a 7,2 (média=7,44) e o bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ) não pode



ter valores menores que 15 mM (média=26,5) (González et al. 2000). Desta forma, todos os tratamentos estavam de acordo para a não ocorrência deste distúrbio durante o experimento. A inclusão de 30% de volumoso na dieta promove adequada fermentação ruminal.

Segundo Kaneko et al. (1997) os valores de globulina (média=30.56 g/L) estão moderadamente abaixo das recomendações (35-57 g/L), e os valores de fosfatase alcalina (média=455,60 UI/L) e GGT (média= 36,81 UI/L) estão acima das recomendações para ovinos (0-387 UI/L e 0-32 UI/L; respectivamente). Uma menor concentração de globulina pode ser devido ao teor elevado de proteína na dieta, oriundas da inclusão de farelo de soja e feno de alfafa que estavam presentes na dieta dos animais. Já um pequeno aumento na concentração de GGT e fosfatase alcalina pode ser indicativo de uma moderada lesão hepática.

As maiores taxas de PG foram obtidas, para todos os óleos, aproximadamente após 12 horas de fermentação, por ocorrer nesse horário a maior fermentação dos carboidratos solúveis. A produção de gás foi completa no período de 24 horas, por isso atualmente as pesquisas *in vitro* com modificadores de fermentação ruminal são realizadas no período máximo de 24 horas, visando determinar outros parâmetros como metano (Araújo et al. 2011; Cobellis et al., 2016; Pinski et al., 2016). A partir de 24 horas observa-se que a PG se manteve constante para todos os tratamentos. A digestibilidade da matéria orgânica (DMO) após 48 horas de incubação foi: 81, 84, 84 e 82% para CON, BOR, CAR e GER (P=0,25; EPM=0,64), respectivamente, sendo esses valores próximos da DMO *in vivo*.

### **Conclusão**

O BOR adicionado a uma dieta de alto teor de concentrado para ovinos foi capaz de aumentar o consumo de matéria seca em 5%, juntamente com um maior consumo de proteína e energia, sem alterar o desempenho. O GER foi capaz de reduzir em 23% a produção diária de metano, sem alterar o desempenho, a digestibilidade, os parâmetros fermentativos e o comportamento dos animais.

### **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

## Referências

- ARAUJO, R C. et al. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology** 166–167: 155-162, 2011.
- BENCHAAR, C. et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology** 145, 209–228, 2008.
- BLANCH, M. et al. Influence of a mixture of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen fermentation, feeding behavior and performance of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. Volume 219, Pag 313–323, 2016.
- BODAS, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology** 176: 78-93, 2012.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253, 2004.
- BUSQUET, M. et al. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal Dairy Science** 89:761–771, 2006.
- CARDOZO, P.W. et al. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v.84, n.10, p.2801- 2808, 2006.
- CASTRO-MONTOYA, J. et al. *In vivo* and *in vitro* effects of a blend of essential oils on rumen methane mitigation. **Livestock Science** 180, pp. 134–142, 2015.
- CANNAS, A. Energy and protein requirements. G. Pulina (Ed.), *Dairy Sheep Nutrition*, CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 31–49, 2004.
- CHAVES, A.V. et al. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs **Animal Feed Science and Technology** 145, 396–408, 2008.
- CHAVES, A.V. et al. A dose response of cinnamaldehyde supplementation on intake, ruminal fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. **Livestock Science** 141, 213–220, 2011.
- CIEŚLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal** 7(2): 253–265, 2013.
- 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** 215: 25–36, 2016
- CRUZ, O.T.B. et al. Effect of glycerine and essential oils (*Anacardium occidentale* and *Ricinus communis*) on animal performance, feed efficiency and carcass characteristics of crossbred bulls finished in a feedlot system. **Italian Journal of Animal Science** 13, 790–797, 2014.

- DA SILVA, C.S. et al. Plant extracts as phytogetic additives considering intake, digestibility, and feeding behavior of sheep. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-7, 2016.
- DURMIC, Z. & BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology** 176, 150–162, 2012.
- FLACHOWSKY, G. & LEBZIEN, P. Effects of phytogetic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. **Animal Feed Science and Technology** 176: 70–77, 2012.
- FRANZOLIN, R. et al. Efeitos de dietas com polpa cítrica em substituição ao milho em grãos no concentrado sobre a degradabilidade e a fauna ruminal em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.2109-2118, 2000.
- GERBER, P. J. et al. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock – A review. **Animal** 7 (Suppl. 2):220–234, 2013.
- GOMES, R. C. et al. Desempenho e digestibilidade de novilhos zebuínos confinados recebendo leveduras vivas e monensina. **Archivos de zootecnia** 60(232), 1077-1086, 2011.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H.O. et al. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: FV-UFRGS, 108p, 2000.
- HART, K.J. et al. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology** 147, 8-35, 2008.
- HRISTOV, A.N.; JOHNSON, K.A.; KEBREAB, E. Livestock methane emissions in the United States. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:E1320, 2014.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. IPCC fourth assessment report (AR4). Working Group 1, **The Physical Science Basis**, 2007.
- KANEKO, J.J. & SMITH, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. *The California Veterinarian*, Sacramento, CA, v.21, n.8, p.21-24, 1967.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5th ed. New York: Academic Press, 1997.
- 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 Animal Science** 91:1819–30, 2013.
- KLEVENHUSEN, F. et al. Diallyl disulphide and lovastatin: effects on energy and protein utilization in, as well as methane emission from, sheep. **Archives of Animal Nutrition** Vol. 65, No. 4, August 2011, 255–266. 2011a.
- KLEVENHUSEN, F. et al. Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane, but improve digestibility in sheep. **Animal Feed Science and Technology** 166–167, 2011b.

- KOZLOSKI, G. V. Bioquímica dos ruminantes. 3 ed. Santa Maria: UFSM. 280p, 2011.
- KUMAR, S. et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 1557–1566, 2009.
- JOHNSON, T.R. & COMBS, D.K. Effects of prepartum diet, inert rumen bulk, and dietary polyethylene glycol on dry matter intake of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.3, p.933-944, 1991.
- JOHNSON, K.; HUHLER, M.; WESTBERG, H.; LAMB, B.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a SF<sub>6</sub> tracer technique. **Environmental Science Technology**, v.28, p.359-362, 1994.
- JOUANY, J.P. & MORGAVI, D.P. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal**, 1. p. 1443-1466, 2007.
- JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483-2492, 1995.
- JESUS, E.F. et al. Influence of a blend of functional oils or monensin on nutrient intake and digestibility, ruminal fermentation and milk production of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology** v. 219, p. 59–67. 2016.
- MALEKKHAHI, M. et al. Effects of essential oils, yeast culture and malate on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance and nutrient digestibility of Baluchi lambs fed high-concentrate diets. **Journal Animal Physiology Animal Nutrition**, 99, pp. 221–229, 2014.
- MAO, H. et al. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, v.129, p.56-62, 2010.
- MAURICIO, R.M. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.79, p.321-330, 1999.
- MEALE, S.J. Et al. Including essential oils in lactating dairy cow diets: effects on methane emissions. **Animal Production Science** 54, 1215–1218, 2014.
- MELLOR, S. Herbs and spices promote health and growth. *Pig Progress*, v. 16, n. 4, p. 18-21, 2000.
- MENKE K.H. et al. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. In: **Journal Agriculture Science** (Cambridge), 92. p. 217-222, 1979.
- MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2.ed. Philadelphia: Sauders. 351p, 2004.
- NRC. *Nutrient requirements of small ruminants. Sheep, goats, cervids and new world camelids*. National Academy Press, WashingtonD.C, 2007.

- ORSKOV, E.R. & McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science** v.92, p.499-503, 1979.
- PATRA, A.K.; KAMRA, D.N.; AGARWAL, N. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. **Animal Feed Science and Technology** 128:276–291, 2006
- PATRA A.K. & SAXENA J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr Res Rev.*;22:204–219. 2009.
- PATRA, A. K. et al. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 13, 2017.
- PERIPOLLI, V. et al. Models for gas production adjustment in ruminant diets containing crude glycerol. **Livestock Research for Rural Development** 26 (2), 2014.
- PINSKI, B.; GÜNAL, M.; ABUGHAZALEH, A. A. The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. **Animal Production Science**, v. 56, n. 10, p. 1707-1713, 2016.
- PRATES, E.R. Técnicas de pesquisa em nutrição animal. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Agronomia. p. 414, 2007.
- RIRA M. et al. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. International Conference on Technologies and Materials for Renewable Energy, Environment and Sustainability, TMREES15. Energy Procedia 74: 15–24, 2015.
- PRADO-RODRÍGUEZ, M. et al. Effects of dietary addition of capsicum extract on intake, water consumption, and rumen fermentation of fattening heifers fed a high-concentrate diet. **Journal Animal Science** 90:1879–1884, 2012.
- ROCHFORT, S.; PARKER, A.J.; DUNSHEA, F.R. Plant bioactives for ruminant health and productivity *Phytochemistry*, 69, pp. 299–322, 2008.
- RUSSELL, J. B. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science** v. 70, n. 11, p. 3551-3561, 1992.
- SAHRAEI, M.; PIRMOHAMMADI, R.; PAYVASTEGAN, S. The effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil on digestibility, ruminal fermentation and blood metabolites of Ghezel sheep fed barley-based diets. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 12(2), 448-454, 2014.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. Statistical analysis system user's guide. Version 8.2. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2001.
- TADESSE, G. Rumen manipulation for enhanced feed utilization and improved productivity performance of ruminants: A review. *Momona Ethiopian Journal of Science* v. 6, n. 2, p. 3-17, 2014.

- TAGER, L. R. & KRAUSE, K. M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** v. 94, n. 5, p. 2455-2464, 2011.
- TAO, M.A. et al. Dietary supplementation with mulberry leaf flavonoids inhibits methanogenesis in sheep. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 1, p. 72-78, 2017.
- THEODOROU, M.K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Anim. Feed Science Technology** 48(1):185-197, 1994.
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VENDRAMINI, T.H.A. et al. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**. 214, 12-21, 2016.
- WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc. of Nutr. Soc.*, 63:621-629, 2004.
- WANG, C. J.; WANG, S.P.; ZHOUC, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep, **Animal Feed Science and Technology** 148, 157–166, 2009.

## **CAPÍTULO IV**

## Considerações finais

Os óleos essenciais testados *in vitro* na quantidade de 1 ml/l de solução promoveram um grande efeito na redução do metano e da amônia, em substituição da monensina sódica. Esses compostos possuem capacidade antimicrobiana comprovada, deste modo já se esperava um efeito modulador da fermentação ruminal. Um efeito positivo durante esse ensaio foi a não redução da digestibilidade da matéria orgânica, sendo esse fator muito importante para a aplicação destes aditivos na nutrição de ruminantes.

Estudos *in vivo* desses compostos são de suma importância para ver a real eficácia nos animais de produção, porém deve ser levado em conta a alta volatilidade que esses óleos possuem. A solução para a sua aplicação seria o processo de microencapsulação, que promoveria a adequada absorção dos componentes por parte do animal. Outra vantagem seria no processo de mistura da ração, pelo pequeno tamanho das partículas, facilitando o manejo. Também no processo de microencapsulação seria possível mascarar o odor de determinados óleos, o que eliminaria a chance de redução de consumo se esse fitocomposto fosse adicionado à dieta.

Os extratos de plantas são uma alternativa menos onerosa que os óleos essenciais e com a mesma função. No presente estudo *in vivo* o custo com esses extratos durante os 60 dias de experimento foi em média de R\$2,40 por animal, se o mesmo fosse realizado com algum óleo essencial do experimento *in vitro* custaria entre R\$1,80 a R\$3,60 reais por animal. Desta forma, os óleos essenciais pelo seu alto custo, se tornam pouco competitivos de serem aplicados pela indústria animal na sua forma pura.

A forma de obtenção dos extratos de plantas (prensagem a frio vs destilação a vapor) e a não concorrência com a indústria farmacêutica e de cosméticos, fazem deles uma opção mais vantajosa. Existem poucos estudos com esses tipos de compostos, talvez existe a possibilidade de a maioria dos mesmos não apresentar efeito na nutrição animal. O óleo de gergelim testado no estudo foi capaz de reduzir a produção de metano em 23% em relação ao tratamento controle, sem alterar a digestibilidade da matéria seca, os parâmetros fermentativos e os sanguíneos. O óleo de borragem adicionado à dieta foi capaz de aumentar o consumo de matéria seca em 5%. Já o óleo de cártamo não foi



capaz de trazer algum benefício satisfatório comparado ao tratamento CON, dentre os parâmetros avaliados.

O uso desses compostos é promissor na indústria animal, por ser uma fonte natural e por haver a possibilidade em médio prazo de os ionóforos serem banidos mundialmente das rações de ruminantes. Deste modo, algumas considerações são importantes para os futuros trabalhos na área:

- A eficiência dos compostos de plantas no controle de bactérias patogênicas.
- Avaliar os óleos essenciais com capacidade antimicrobiana que ainda não foram testados *in vitro*, bem como a dosagem mais efetiva. No segundo momento realizar testes *in vivo*. A importância de fazer posteriores avaliações *in vivo* é para não excluir extratos de plantas que poderiam ser promissores, porém não apresentaram resultados satisfatórios *in vitro*.
- Padronização nos estudos *in vitro*, já que existem muitas variações nessa prática de avaliação. Divergências nas metodologias impossibilitam comparações.
- Informação dos principais componentes dos óleos, realizada através de cromatografia gasosa, visto que existem diferenças na composição dos mesmos.
- Estudos *in vitro* que apresentam resultados positivos possuem uma dosagem muito alta se for extrapolado para um estudo *in vivo*, o que seria inviável para sua aplicação.
- Estudos *in vivo* são em sua maioria de curta duração (máximo 21 dias), desta forma não é possível mensurar se ocorreu adaptação dos microrganismos pelos óleos utilizados.
- Avaliar se ocorrem alterações na qualidade organoléptica e na composição química dos produtos gerados (carne e leite) por animais que recebam esses aditivos e se interfere no tempo de prateleira desses produtos.
- Novas pesquisas migram para a avaliação de blends (misturas) de óleos essenciais, testando um efeito sinérgico dos mesmos, porém um efeito antagônico pode ocorrer.
- Avaliar a eficácia de aditivos redutores de metano em sistemas de produção a base de pasto.

**Referências bibliográficas**

AGARWAL, N. et al. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.148, p.321–327, 2009.

ANDRADE, W.R.; ARAGÃO, R.F.; SOBREIRA, M.V.S. Óleo de gergelim: uma importante fonte de ácidos graxos e elevado valor nutricional. In: CONGRESSO NACIONAL DE CIÊNCIAS DA TERRA, 2014, Cajazeiras. **Anais...** Cajazeiras, 2014.

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

BENCHAAR, C. et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.145, p.209-228, 2008.

BELTRÃO, N.E; M.; FREIRE, E.C.; LIMA, E.F. **Gergelim cultura no trópico semi-árido nordestino**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1994. 52p.

BENCHAAR, C. et al. Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. **Journal of dairy science**, Champaign, v.89, n.11, p.4352-4364, 2006.

BENCHAAR, C. 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**, Champaign, v.90, n.2, p.886-897, 2007.

BENCHAAR, C; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.166, p.338-355, 2011.

BENCHAAR, C. et al. Effects of increasing amounts of corn dried distillers grains with solubles in dairy cow diets on methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. **Journal of dairy science**, Champaign, v. 96, n.4, p.2413-2427, 2013.

BENDAHAN, A.B. Confinamento de cordeiros: uma alternativa na ovinocultura. 2006. Disponível em: <<http://www.agroline.com.br/artigos/artigo.php?id=304>>. Acesso: Nov. 2006.

BRUGALLI I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas. **Anais...** Campinas, 2003. p.167-182.

BRUSS, M.L. Lipids and ketones. Clinical biochemistry of domestic animals. **Academic Press**, San Diego, v.6, p.81-115, 2008.

BOADI, D. K.; NEUFELD, R. J. Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. **Enzyme and Microbial Technology**, Iowa, v. 28, n.7, p.590-595, 2001.

BUENO, M. S. et al. Características de carcaças de cordeiros Suffolk abatidos em diferentes idades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.6, p.1803- 1810, 2000.

BUSQUET, M. et al. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.88, p.4393–4404, 2005.

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 Animal Science**, Champaign, v.83, p.2572–2579, 2005.

CALSAMIGLIA, S. et al. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.90, p.2580-2595, 2007.

CIESLAK, A. et al. Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, Cambridge, v.7, p.253-265, 2013.

CERVIERI, R.C.; CARVALHO, J.C.F.; MARTINS, C.L. Evolução do manejo nutricional nos confinamentos brasileiros: importância da utilização de subprodutos da agroindústria em dietas de maior inclusão de concentrado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2009, Botucatu. **Anais...Botucatu**, 2009. p.2-22.

COLE, N. A. et al. Interaction of grain co-products with grain processing: Associative effects and management. In: GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, MP-177, Stillwater, 2009, **Proceedings of the...** Stillwater, Oklahoma State University, 2009. p.193-205.

CHAVES, A. V. et al. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.88, p.117-122, 2008.

DA SILVA, P. A. A.; MEJIA, D. P. M. **Atividade antimicrobiana do óleo essencial de Melaleuca alternifolia (tea tree) para uso como coadjuvante em antissépticos**. Disponível em: <[http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/39/08\\_Atividade\\_antimicrobiana\\_do\\_Yleo\\_essencial\\_de\\_Melaleuca\\_alternifolia\\_-\\_tea\\_tree.pdf](http://portalbiocursos.com.br/ohs/data/docs/39/08_Atividade_antimicrobiana_do_Yleo_essencial_de_Melaleuca_alternifolia_-_tea_tree.pdf)>. Acesso em: Nov. 2016.

DOREAU, M. et al. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. **Productions Animales**, Paris, v.24, n.5, p.461-474, 2011.

ENCINIAS, H. B et al. High linoleic acid safflower seed supplementation for gestating ewes: effects on ewe performance, lamb survival, and brown fat stores. **Journal of animal science**, Champaign, v. 82, p.3654-3661, 2004.

ELLIS, J. L. et al. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modeling of methane production in cattle. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 146, p.213-233, 2008.

FAO. **Climate change and land use: causes and impacts**. Rome, Italy, 2002.

FAO. **Tackling climate change through livestock: a global assessment of emissions and mitigation opportunities**. Rome, 2013.

FERNANDES, S.R. et al. Early weaning and concentrate supplementation on the performance and metabolic profile of grazing lambs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.41, p. 1292-1300, 2012.

FITOTERÁPICOS. **Borragem**. 2015. Disponível em: <<http://www.fitoterpicos.info/-borragem.php>>. Acesso: Nov. 2015.

FRANZOLIN, R. et al. Efeitos de dietas com polpa cítrica em substituição ao milho em grãos no concentrado sobre a degradabilidade e a fauna ruminal em bubalinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, p.2109-2118, 2000.

FRESCURA, R. F. M. et al. Sistemas de Alimentação na Produção de Cordeiros para Abate aos 28 kg. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, p.1267-1277, 2005.

FUKUDA, Y. et al. Chemical aspects of the antioxidative activity of roasted sesame seed oil and the effect of using the oil for frying. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v.50, n.4, p.857-862, 1986.

GASTALDI, K.A.; SOBRINHO, A.G.S. Desempenho de ovinos F1 Ideal x Ile de France em confinamento com diferentes relações concentrado:volumoso. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu, 1998. p.257-259

GERBER, P.J et al. **Tackling climate change through livestock – a global assessment of emissions and mitigation opportunities**. Rome: FAO, 2013.

GIANNENAS, I. et al. Essential oils and their applications in animal nutrition. **Medical and Aromatic Plants**, Nova Deli, v.2, p.1-12, 2013.

GONÇALVES, M. F. et al. Ionóforos na alimentação de bovinos. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.18, p.131-146, 2014.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre, 2006. 357p.

GROTTO H.Z.W. O hemograma: a importância para a interpretação da biópsia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, p.178-182, 2009.

HALES, K. E. et al. Effects of crude glycerin in steam-flaked corn-based diets fed to growing feedlot cattle. **Journal of animal science**, Champaign, v.91, n.8, p.3875-3880, 2013.

HASSANAT, F. et al. Replacing alfalfa silage with corn silage in dairy cow diets: Effects on enteric methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, n.7, p.4553-4567, 2013.

HAQUE, M. N. et al. Estimation of methane emission using the CO<sub>2</sub> method from dairy cows fed concentrate with different carbohydrate compositions in automatic milking system. **Livestock Science**, Miles, v.164, p.57-66, 2014.

HEGARTY, R. S. et al. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of animal science**, Champaign, v.85, n.6, p. 1479-1486, 2007.

HENDRIX, C. M.; SIROIS, M. **Laboratory procedures for veterinary technicians**. St. Louis, 2007. v.5, 400p.

HRISTOV, A. N et al. Mitigation of methane and nitrous oxide emission from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.91, p.5045-5069, 2014.

INKANAT. **Óleo de Borragem**: benefícios e indicações. Disponível em: <<http://www.inkanat.com/pt/arti.asp?ref=oleo-de-borragem>>. Acesso em: Nov. 2015.

JALC, D. et al. **Effect of microbial oil, evening primrose oil and borage oil on rumen fermentation in vitro**. Bareli: Veterinary Research Institute, 2005. v.50, 480p.

JOCH, M. et al. in vitro screening of essential oil active compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation. **Asian Australasian Journal Animal Science**, Korea, v.29, p.952-959. 2016.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.8, p.2483-2492, 1995.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego, 2008. 916p.

KHORRAMI, B. et al. Thyme and cinnamon essential oils: Potential alternatives for monensin as a rumen modifier in beef production systems. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.200, p.8-16, 2015.

KERR, G. M. **Exames laboratoriais em Medicina Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003. 436p.

KISIDAYOVA, S. et al. The effect of microbial oil, evening primrose oil, and borage oil on rumen ciliate populations in an artificial rumen (Rusitec). **Journal of Animal and Feed Science**, Amsterdam, v.15, p.153-156, 2006.

KLOPFENSTEIN, T. J. et al Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. **Journal of animal science**, Champaign, v.86, p.1223-1231, 2008.

KNAPP, J.R. et al. Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.97, p.3231-3261, 2014.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: UFSM, 2002. 140p.

KUMAR, S. et al. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. **Applied microbiology and biotechnology**, Munster, v.98, p.31-44, 2014.

LILA, Z.A. et al. Effect of saponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.10, p.3330- 3336, 2003.

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.

MAGALHÃES, R.T. et al. Avaliação de quatro genótipos de sorgo pela técnica in vitro semiautomática de produção de gases. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.5, p.101-111, 2006.

MARSIGLIO, B. N. et al. **Óleos funcionais em dietas de alto grão para ovinos e efeitos sobre a digestibilidade dos nutrientes, desempenho, características da carcaça e do músculo Longissimus dorsi**. 2012. Dissertação (Mestrado) – UEM, 2012.

MARTÍN, Á. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: applications with essential oils. **Open Chemical Engineering Journal**, Sharjah, v.4, n.1, p.31-41, 2010.

MAURICIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.79, p.321-330, 1999.

MCGEOUGH, K. L. et al. The effect of cattle slurry in combination with nitrate and the nitrification inhibitor dicyandiamide on in situ nitrous oxide and dinitrogen emissions. **Biogeosciences**, Gottingen, v.9, p.4909-4919, 2012.

MCGINN, S.M. et al. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.82, p.3346-3356, 2004.

MCGINN, S. M. et al. Use of corn distillers' dried grains to reduce enteric methane loss from beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v.89, p.409-413, 2009.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FORAGE Quality, Evaluation, and Utilization. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1994. p.450– 493.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis**. Philadelphia, Saunders, 350p., 1992.

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

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 2 ed., Philadelphia: Saunders, 2004. 351p.

MOHAMMED, N. et al. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.116, p.301-311, 2004.

MOREIRA, P.C. et al. Avaliação de alimentos pela técnica semiautomática in vitro de produção de gases: uma revisão. **Estudos**, Goiânia, v.35, p.357-374, 2008.

MORETTO, E.; FETT, R. **Definição de óleos e gorduras tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 144p.

MOSS, A. R.; PIERRE, J.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, Les Ulis, v.49, n.3, p.231-253, 2000.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washinton, National Academic Press, 2001. 381p.

NATURELL. **[Informações obtidas no site]**. Disponível em: <[http://naturell.com.br/wpcontent/uploads/2015/02/Literatura\\_C%C3%A1psula\\_Oleosa\\_de\\_C%C3%A1rtamo.pdf](http://naturell.com.br/wpcontent/uploads/2015/02/Literatura_C%C3%A1psula_Oleosa_de_C%C3%A1rtamo.pdf)>. Acesso em: Nov. 2015.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, 2001.

OLESEN, J.E. et al. Modelling greenhouse gas emissions from European conventional and organic dairy farms. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.112, p.207-220, 2006.

OJEU. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of European Union**, [S.l.], 18/10/2003, L268/36, 2003.

OLIVEIRA, M. V. M. et al. Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, p.1763-1774, 2005.

OMAR, J.M.A. Effects of feeding different levels of sesame oil cake on performance and digestibility of Awassi lambs. **Small ruminant research**, Amsterdam, v.46, p. 187-190, 2002.

OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. **Fermentación ruminal**: el ruminante, fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza, Acríbia, 1993. p.159-190.

OWENS, F. N. et al. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.75, p.868-879, 1997.

PADETEC. **Óleo de alho**. 2015. Disponível em: <<http://www.padetec.ufc.br/novapagina-/vendas/livroali/cap6.pdf>>. Acesso em: Nov. 2015.

PATRA, A. K. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.90, p.2700-2708, 2010.

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.78, 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**, Lahore, v.3, p.67–74, 2014.

PORTAL DA EDUCAÇÃO. **[Informações obtidas no site]**. Disponível em: <<https://www.portaleducacao.com.br-/nutricao/artigos/18718/oleo-de-cartamo>>. Acesso em: Nov. 2015



RANGEL, A. H. D. N. et al. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Aracajú, v.8, p.173-182, 2008.

RESTLE, J.; BRONDANI, I. L.; BERNARDES, R. A. C. O novilho superprecoce. Confinamento, pastagens e suplementação para produção de bovinos de corte. **Ciência Rural**, Santa Maria, p.191-214, 1999.

RICCÓ, D. Indicadores sanguíneos e corporais de avaliação metabólico-nutricional em ruminantes. In: SEMINÁRIO APRESENTADO NA DISCIPLINA BIOQUÍMICA DO TECIDO ANIMAL DO PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2004. [**Anais**]. [Porto Alegre, 2004.]

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

RUSSEL, J. B.; HOULIHAN, A. J. Ionophore resistente of de ruminal bacteria its potential impact of human health. **Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.27, n.1, p.65-74, 2003.

SÁ, J. L.; SÁ, C. O. **Carcaças e carnes ovinas de alta qualidade**: revisão. 2012. Disponível em: <<http://www.crisa.vet.br/revisão>>. Acesso em: Dez. 2012.

SAMAL, L. et al. Impact of phytogetic feed additives on growth performance, nutrient digestion and methanogenesis in growing buffaloes. **Animal Production Science**, Amsterdam, 2016.

SALMAN, A. K. D.; PAZIANI, S.F.; SOARES, J.P.G. **Utilização de ionóforos para bovinos de corte**. Rondônia: Embrapa, 2006. (Documentos).

SANTOS, C. A. J. et al. Toxic hepatopathy in sheep associated with the ingestion of the legume Tephrosia cinerea. **Journal Veterinary Diagnosis Investigation**, Columbia, v.19 p.690-694, 2007.

SARROU, E. et al. Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of Citrus aurantium L. growing. **Greece Molecules**, Atenas, v.18, p.10639-10647, 2013.

SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal Animal Science**, Champaign, v.58, p.1518-1527, 1984.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal Animal Science**, Champaign, v.72, p.2980-2991, 1994.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia. **Revista Ceres**, Viçosa, v.57, p.589-594, 2010.

SIQUEIRA, E.R.; AMARANTE, A.F.T.; FERNANDES, S. Estudo comparativo da recria de cordeiros em confinamento e pastagem. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v.5, p.17-28, 1993.

STEINFELD, H. et al. **Livestock's long shadow: environmental issues and options**. Rome: FAO, 2006. 375p.

TAGER, 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**, Champaign, v.94, p.2455-2464, 2011.

TAVISH, H.M.; HARRIS, D. An economic study of essential oil production in the UK: a case study comparing non-UK lavender/lavandin production and peppermint/spearmint production with UK production techniques and costs. In: FOR THE GOVERNMENT INDUSTRY, FORUM FOR NON-FOOD CROPS, 2002, Edinburg. **[Proceedings]**. Edinburg, 2002.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. 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.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, London, v.18, p.104-111, 1963.

TOMKINS, N. W. et al. Manipulating rumen fermentation and methanogenesis using an essential oil and monensin in beef cattle fed a tropical grass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.200, p.25-34, 2015.

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

VELLUTI, A. et al. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v.89, p.145-154, 2003.

WANG, J. et al. Medicinal herbs as a potential strategy to decrease methane production by rumen microbiota: a systematic evaluation with a focus on *Perilla frutescens* seed extract. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v.100, p.9757-9771, 2016.

YANG, S.A. et al. Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. **Natural Product Research**, Munster, v.24, p.140-151, 2010.

YESILBAG, D. et al. Effects of juniper essential oil on growth performance, some rumen protozoa, rumen fermentation and antioxidant blood enzyme

parameters of growing Saanen kids. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Malden, v.1, p.1-10, 2016.

ZEOULA, L. M. et al. Digestibilidade parcial e total de rações com a inclusão de ionóforo ou probiótico para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.37, p.563-571, 2008.

## APÊNDICES

Apêndice 1- Características do óleo de borragem (CAS: 84012-16-8)

Características	Resultado
Cor (25°C)	amarelo
Densidade (25°C g/MI)	0,917
Estado físico (25°C)	líquido viscoso
Índice de acidez (mg KOH/g)	1,60
Índice de iodo (wijs)	-
Índice de peróxido (meq/kg)	1,5
Índice de refração (n <sub>d</sub> 40°C)	-
Índice de saponificação (mg KOH/g)	191,00
Odor (25°C)	característico
Bactérias totais	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Fungos e leveduras	<10 <sup>2</sup> UFC/g
Coliformes totais	ausente
E. coli	ausente
Staphylococcus aureus	ausente
Pseudomonas SP	ausente

Apêndice 2- Características do óleo de cártamo (CAS: 8001-23-8)


Características	Resultado
Cor (25°C)	amarelo
Densidade (25°C g/MI)	0,915
Estado físico (25°C)	líquido viscoso
Índice de acidez (mg KOH/g)	1,72
Índice de iodo (wijs)	121,25
Índice de peróxido (meq/kg)	2,59
Índice de refração (n <sub>d</sub> 40°C)	1,4720
Índice de saponificação (mg KOH/g)	186,20
Odor (25°C)	característico
Bactérias totais	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Fungos e leveduras	<10 <sup>2</sup> UFC/g

Coliformes totais	ausente
E. coli	ausente
Staphylococcus aureus	ausente
Pseudomonas SP	ausente

Apêndice 3- Características do óleo de gergelim (CAS: 8008-74-0)

Características	Resultado
Cor (25°C)	amarelo
Densidade (25°C g/ml)	0,916
Estado físico (25°C)	líquido viscoso
Índice de acidez (mg KOH/g)	1,22
Índice de iodo (wijs)	109,19
Índice de peróxido (meq/kg)	2,37
Índice de refração (n <sub>d</sub> 40°C)	1,4730
Índice de saponificação (mg KOH/g)	183,24
Odor (25°C)	característico
Bactérias totais	<10 <sup>3</sup> UFC/g
Fungos e leveduras	<10 <sup>2</sup> UFC/g
Coliformes totais	ausente
E. coli	ausente
Staphylococcus aureus	ausente
Pseudomonas SP	ausente

## Apêndice 3- Carta aprovação: Comissão de Ética no Uso de Animais

  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CARTA DE APROVAÇÃO**

**Processo Nº: 23078.012067/2015-83**

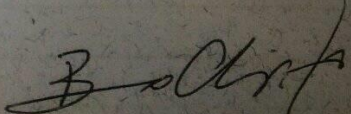
**TÍTULO: Óleos funcionais na dieta de cordeiros confinados e suas influências sobre a metanogênese.**

**Pesquisador Responsável: Enio Rosa Prates.**

**PARECER**

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 10/08/2015 - Sala 323 - Anexo I do Prédio da Reitoria- Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre - RS; em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 16 ovinos machos, mestiços Corriedale x Ile de France, idade aproximada de 7 meses, peso médio de 25 kg, provenientes da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA-UFRGS), de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa. Registra-se ainda a utilização de dois ovinos fistulados há cerca de 8 anos e mantidos nas dependências do Setor de Ruminantes do Laboratório de Ensino Zootécnico (LEZO) do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia.

**Porto Alegre, 24 de Agosto de 2015**

  
Bruno Cassel Netto  
Vice Pró-Reitor de Pesquisa

Apêndice 4- Dados de temperatura e umidade do experimento *in vivo*

Data	Temp. máxima (°C)	Temp. mínima (°C)	Umidade máxima (%)	Umidade mínima (%)
07/mai	26,5	15,9	99	63

08/mai	20,6	18,4	97	83
09/mai	22,9	18	99	73
10/mai	23,9	18,3	98	76
11/mai	22,2	17	99	82
12/mai	16,2	13,5	99	74
13/mai	16,6	9	99	72
14/mai	16,5	12,2	99	82
15/mai	24,1	14,5	99	65
16/mai	17,8	14,5	90	88
17/mai	15,6	10	91	73
18/mai	14,5	8,1	89	59
19/mai	15,5	6,5	90	66
20/mai	16,3	7	96	65
21/mai	15,8	11,4	99	87
22/mai	17,2	11,4	99	84
23/mai	15,8	9,6	98	87
24/mai	15,9	6,3	99	74
25/mai	18,1	9,4	99	73
26/mai	19,9	10,5	99	72
27/mai	19,8	14,2	99	69
28/mai	17	12,7	99	80
29/mai	22,6	15,5	99	74
30/mai	18,9	16,6	99	74
31/mai	19,2	14	99	72
01/jun	18,3	9,8	99	71
02/jun	17,5	11	98	70
03/jun	16,6	10,1	95	70
04/jun	16,6	8	95	69
05/jun	13,7	5,7	97	75
06/jun	14,2	7,9	98	69
07/jun	13,7	7,4	92	69
08/jun	15,6	7,7	92	59
09/jun	14,5	4,8	87	45
10/jun	13,4	4,9	84	43
11/jun	12,2	4,4	87	50
12/jun	12,2	4,4	87	50
13/jun	13,5	2,3	83	55
14/jun	16,3	2	91	60
15/jun	17,2	6,6	91	64
16/jun	18,8	6,6	99	64
17/jun	14,3	10,4	94	80
18/jun	13,4	7,2	99	78
19/jun	12,3	4,8	99	78
20/jun	10,1	7,2	99	78
21/jun	13,5	8,2	99	65

22/jun	17,3	9,9	99	63
23/jun	15,4	12,5	99	94
24/jun	17,3	7,2	99	76
25/jun	18	8,7	99	75
26/jun	18,4	10,4	99	75
27/jun	20,1	12,6	99	72
28/jun	17,9	12,7	99	84
29/jun	15,8	12,9	99	84
30/jun	16,7	12	99	84
01/jul	16,1	12,3	99	84
02/jul	23,1	11,5	99	74
03/jul	24	12,2	99	69
04/jul	26,1	12,1	99	58
05/jul	26,4	15,4	99	51
06/jul	25,7	14,8	99	56

Apêndice 5- : Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação na Asian-Australasian Journal of Animal Sciences



## Asian-Australasian Journal of Animal Sciences

### Manuscript Submission - Guide for Authors

#### ○ SUBMISSION OF A MANUSCRIPT

- 1) Manuscripts must be prepared in double space with Times New Roman font (size 10) and submitted via on-line system ([www.ajas.info](http://www.ajas.info)). All pages should be numbered consecutively in the top right hand corner, beginning with the title page.
- 2) The lines on all pages, including those pages for REFERENCES and figure-legends, must be numbered consecutively in the left margin, beginning with number one at the top of the title page. A 2.5 cm margin on both sides of the page is desirable. The type should be large enough to be easily read (i.e. a font size of at least 10 points).
- 3) Tables, typed double-spaced, should be as few and as simple as is feasible. Each table should be on a separate sheet. Weights and measures must be expressed in the metric system and temperatures in the celsius (centigrade) scale.
- 4) The legends for figures should be typed on a separate sheet. Photographs should be carefully prepared so that clear image can be printed. Use large letters and numbers, especially for figures that are to be published in one column in the journal.
- 5) Manuscripts will be edited in the order received and accepted papers will be published in the order submitted if at all possible.



- 6) Authors whose native language is not English are strongly encouraged to have their papers proof read, prior to submission, to improve the English content of their paper.
- 7) It is important to indicate in the text that the protocol for the animal research has been approved by a suitably constituted ethics committee of the institute. Refer to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Seoul, 2008), available at WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. AJAS retains the right to reject any manuscript on the basis of unethical conduct of animal studies.
- 8) Authors must declare, if any, financial support or relationships that may pose conflict of interest.

## ○ STRUCTURE OF MANUSCRIPTS

- 1) **TITLE** **PAGE**  
 The first page of each manuscript starts with the title of the paper which should be typed in bold-faced print using both upper and lower case letters and set in the center of the page. Although the title should be as brief as possible, include the species involved in the research when applicable. Abbreviations are not permitted in the title. The names of the authors follow and you may choose to use either initials (first and middle) or full name(s) and last name but you should be consistent and use the same format for all authors. Indications of professorial rank or other professional titles should not be used. Naming an author on a paper implies that the person named is aware of the research reported and agrees with and accepts responsibility for any results or conclusions reported. The address of the institution where the research was conducted follows and the address should include the name of the institution, city, country and zip code. This should be typed on as few lines as possible using upper and lower case letters. When a paper has several authors from different institutions, key the author to the address with superscript Arabic numerals and present the additional addresses as footnotes at the bottom of the page. Addresses for reprints and changes of address should also be given as footnotes and should be keyed using the same number system as for addresses. Footnotes on the first page and other text pages are referenced sequentially by superscript numbers. A running head (an abbreviated title consisting of no more than 45 characters plus spaces) should also appear centered on the title page. Also include the phone number, fax number, and E-mail address of the contact author on the title page.
- 2) **ABSTRACT**  
 The abstract, consisting of no more than 400 words, appears on a separate page following the title page. The word ABSTRACT (aligned with the left margin) is printed in bold face print using capital letters and should be followed by a colon. The text of the abstract should start on the same line immediately following the colon. The abstract should summarize pertinent results in a brief but understandable form. The abstract should start with a clear statement of the objectives of the experiment and must conclude with one or two sentences that highlight important conclusions. References are never cited in the abstract. Abbreviations that appear in the abstract that are not included in the standard abbreviation listing found in each issue of AJAS must be defined before they are first used.
- 3) **KEY** **WORDS**  
 At the end of the abstract, list up to six key words that best describe the nature of the research. The term "Key Words" is typed in bold-faced print followed by a colon. The first letter of each key word is capitalized and key words are separated by commas. The entire line should be centered on the page and surrounded by brackets. Key words should include the species, variables tested, and the major response criteria. Key words must be selected from the most recent issues of the CAB Thesaurus (available from C.A.B. International, 845 North Park Avenue, Tucson, AZ 85719; Telephone: 800-528-4841.) American spelling of words is used. Key words form the basis for the subject index, which is published in the last

issue of each volume of AJAS. Because major words in the title are not used in the subject index, appropriate words from the title (or synonyms) should be listed as key words.

#### 4) **HEADINGS**

Major headings (INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION [or RESULTS AND DISCUSSION], and REFERENCES) are centered and appear in roman type, with the entire heading capitalized using bold-faced type. Major headings of review papers or papers from symposia may deviate from this standard format; however, all papers must contain an abstract, key words, and an introduction. Abbreviations should be avoided in headings. First subheadings appear at the left margin on a separate line in bold-faced print and are not followed by punctuation. Only the first word is capitalized. First subheadings are used when subsections below major headings consist of several paragraphs, especially if some or all of the paragraphs begin with a second subheading. Second subheadings appear at the beginning of the first line of a paragraph. They are italicized and followed by a period. They do not require labeling (a, b, c, etc.). Second subheadings may be used with or without first subheadings; generally second subheadings introduce sections three to four paragraphs in length or longer sections below a first subheading.

#### 5) **INTRODUCTION**

The introduction starts on a new page following the abstract. The introduction briefly justifies the research and specifies the hypotheses to be tested. Extensive discussion of relevant literature should be included in the discussion of results, not in the introduction. To minimize length and avoid redundancy, generally no more than three references should be cited to support a specific concept.

#### 6) **MATERIALS AND METHODS**

(1) General: A clear description or specific original reference is required for all biological, analytical, and statistical procedures used in the experiment. All modifications of procedures must be explained. Diets, animals (breed, sex, age, body weight, and weighing conditions [i.e., with or without restriction of feed and (or) water]), surgical techniques, measurements, and statistical models should be described clearly and fully. Brand names and company names and locations for all substances and equipment referred to in the text should be included in parentheses within the text, not in footnotes.

(2) Statistics: Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. When possible, results of similar experiments should be pooled statistically. Do not report a number of similar experiments separately.

#### 7) **RESULTS**

Results (may be combined with discussion) should be presented in tabular form when feasible. The text should explain or elaborate on the tabular data, but numbers should not be repeated extensively within the text. Sufficient data, all with some index of variation attached, should be presented to allow the reader to interpret the results of the experiment.

**8) DISCUSSION**

The discussion (may be combined with results) should interpret the results clearly and concisely in terms of biological mechanisms and should integrate literature results with the research findings to provide the reader with a broad base on which to accept or reject the hypotheses tested. Results and references to tables and figures already described in the RESULTS section should not be repeated in the DISCUSSION section.

**9) IMPLICATIONS (Optional)**

This section, consisting of no more than 1,000 characters plus spaces in one paragraph, follows the discussion and should explain in lay terms, without abbreviations, acronyms, or citations, what the findings of this research imply for animal production and (or) biology. Though some speculation is permitted, this section should also caution the reader against over extrapolation of results. For manuscripts with direct applications, this section will consist of an interpretive summary. If results have no implications, this should be stated.

**10) REFERENCES**

The Harvard (author, date) system of referencing is used (examples are given below).

- (1) Reference citations in the text: Black (1971) or (Black, 1971); Dickerson et al. (1974) or (Dickerson et al., 1974); Smith and Jones (1977) or (Smith and Jones, 1977).
- (2) Groups of references cited in a sentence in the text must be listed in chronological order as in the previous sentence.
- (3) REFERENCES lists should be typed in alphabetical order.
- (4) Refrain from citing unnecessary references. Less than 30 references are recommended.

Samples of reference citations.

**Standard Journal Articles:**

- JJensen, M. S., S. K. Jensen and K. Jakobsen. 1997. Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *J. Anim. Sci.* 75:437-445.
- Jin, C. F., J. H. Kim, H. K. Moon, W. T. Cho, Y. K. Han and I. K. Han. 1998a. Effects of various carbohydrate sources on the growth performance and nutrient utilization in pigs weaned at 21 days of age. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 11:285-292.
- Jin, C. F., J. H. Kim, I. K. Han, H. J. Jung and C. H. Kwon. 1998b. Effects of various fat sources and lecithin on the growth performance and nutrient utilization in pigs weaned at 21 days of age. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 11:176-184.

**Journal Article with a Subtitle :**

- Ackerson, R. C. 1981. Osmoregulation in cotton in response to water stress: 1. Alterations in photosynthesis, translocation and ultrastructure. *Plant Physiol.* 67:484-488.

**Online article not yet published in an issue :**

An online article that has not yet been published in an issue can be cited by its Digital Object Identifier (DOI).

Devendra C. 2013. Investments on Pro-poor Development Projects on Goats:

Ensuring Success for Improved Livelihoods. Asian Australas. J. Anim. Sci., 2013  
<http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2013.r.01>

**Citation from web sites :**

Sample size calculation. Grapentine Co. Inc.  
<http://www.grapentine.com/calculator.htm>. Accessed December 6, 2005

**Abstracts and Supplements :**

Mahan, D. C., E. M. Weaver and L. E. Russell. 1996. Improved postweaning pig performance by adding NaCl or HCl to diets containing animal plasma. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1):58(Abstr.).  
 Smith, J. W., M. D. Tokach, R. D. Goodband, J. L. Nelssen, W. B. Nessmith, K. Q. Owen and B. T. Richert. 1995. The effect of increasing zinc oxide supplementation on starter pig growth performance. *J. Anim. Sci.* 73(Suppl. 1):72(Abstr.).

**Journal Article Accepted but not yet Published :**

Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Bleccha, R. D. Klemm, D. W. Giesting, J. D. Hancock, G. L. Allee and R. D. Goodband. 1999. Measuring suitability of soybean products for early-weaned pigs with immunological criteria. *J. Anim. Sci.* (In press).

**Standard Book :**

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.  
 National Research Council. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th Ed. National Academy Press, Washington, DC.  
 SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT User's Guide: Version 6. 4th edn. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.  
 Snedecor, G. W. and W. C. Cochran. 1989. Statistical Methods. 8th Ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa.  
 Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd edn. McGraw-Hill Book Company, New York, New York.

**Chapter in an Edited Book :**

Cranwell, P. D. and P. J. Moughan. 1989. Biological limitations imposed by the digestive system to the growth performance of weaner pigs. In: *Manipulating Pig Production II* (Ed. J. L. Barnett and D. P. Hennessy). Australasian Pig Science Association, Werribee, Australia. pp. 140-159.  
 Cromwell, G. L. 1991. Antimicrobial agents. In: *Swine Nutrition* (Ed. E. R. Miller, D. E. Ullrey and A. J. Lewis). Butterworth-Heinemann, Stoneham, Massachusetts. pp. 297-314.  
 Mayes, P. A. 1990. Digestion and absorption. In: *Harpers Biochemistry*, 22nd Ed. (Ed. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes and V. W. Rodwell). Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut. pp. 580-590.

**Thesis :**

Thacker, P. A. 1981. Effects of Dietary Propionate on Lipid Metabolism in Growing Swine. Ph.D. Thesis, University of Alberta, Edmonton, Alberta.

Trottier, N. L. 1995. Protein Metabolism for the Lactating Sow. Ph.D. Thesis, University of Illinois, Urbana, Illinois.

#### **Conference Proceedings :**

Goodband, R. D., M. D. Tokach, S. S. Dritz and J. L. Nelssen. 1995. Practical nutrition for the segregated early weaned pig. In: Proceedings of the 1995 Saskatchewan Pork Industry Symposium, Saskatoon, Saskatchewan. pp. 15-22.  
Shurson, J., L. Johnston, J. E. Pettigrew and J. Hawton. 1995. Nutrition and the early weaned pig. Proceedings of the Manitoba Swine Seminar. Vol. 9:21-32.

#### **Research Reports etc .:**

Lutz, T. L. and T. S. Stahly. 1996. Dietary folic acid needs of high lean growth pigs. Iowa State University 1997 Swine Research Report. pp. 4-6.  
Unpublished Memos, Letters, Personal Communications (Cited in Text Only) (L. G. Campbell, pers. comm., University of Saskatchewan, Saskatoon, SK). (A. J. Smith, unpubl. data).

### **11) TABLES**

Tables are used to present numerical data in a self-explanatory manner. They should be intelligible without consulting the text and should not duplicate data already given in the text or in illustrations. Any abbreviation used in a table must be defined in that table. Tables should be typed double-spaced with each table on a separate sheet. Place tables immediately after the list of figure legends or references if there are no figures. Paginate the tables in series with the text.

All tables should be cited in the text. Arabic numerals are used to number tables. The table number (i.e. Table 4.) is typed in bold face followed by a period. The title of the table continues on the same line with only the first letter capitalized. Do not use a period at the end of the title. Column headings should have the first letter of each word capitalized while the names of variables are typed with only the first letter capitalized (i.e. Average daily gain).

For numerals less than 1, insert a zero to the left of the decimal point (columns should be set up so that decimal points are aligned if possible). If there are no data for a particular entry, insert a dash. If an explanation is necessary, use an abbreviation in the body of the table (e.g. ND) and explain clearly in footnotes what the abbreviation means. Care should be taken to ensure that greater accuracy is not implied in the table than is possible from a particular analysis and only significant figures should be used. It is exceedingly rare where accuracy greater than two decimal places is obtained.

References to footnotes in a table are specified by superscript numbers, independently for each table. Superscript letters are used to designate statistical significance. Use a lower case p to indicate probability values (i.e. p0.05).

Presentation of pooled standard errors, the general basis for statistical comparisons of means is recommended when variance is homogeneous. These should be presented in a separate column or row. Standard errors can be attached to each mean by  $\pm$  signs when variance or SE are heterogeneous (e.g. unbalanced experiments or unequal numbers of observations in treatment means). The pooled standard error is the preferred estimate of experimental error because presenting individual standard errors tends to clutter up the table.

For diet composition, present major ingredient inclusion levels as a percentage of the total rather than in g/kg of diet.

### **12) FIGURES**

Figures should be placed at the end of the manuscript with each figure placed on a separate page. Figure legends should be typed (double spaced) on a separate page.

Prepare figures to fit one column (8cm wide), or full-page width (17 cm wide). A minimum

type size of 8 points (Times New Roman) is recommended so as to be readable at final publication size.

For multiple lines tables, please use solid, long-dash, short-dash, and dotted lines, and avoid gray or shaded lines as these will not reproduce well. Lines with different symbols for the data points may also be used to distinguish curves. Also remove unnecessary backgrounds and grid lines from graphs. Each axis should have a description and a unit.

For bar charts, please use different fill patterns if needed (black, white, gray, and stripes). Identify curves and data points using the following symbols (●, ○, ■, □, ◆, ◇, ▲, △, +, and ×). Symbols should be defined in the figure legend or in a key on the figure.

Preferred format for figures are Word, EPS, JPEG, PDF, and TIFF. If figures are to be reproduced in grayscale (black and white), submit in grayscale. If figures are to appear in color in the print journal, files must be submitted in CMYK color (not RGB). Minimum resolution is 300 dpi for color and grayscale figures and 600 dpi for line art.

Photomicrographs must have their unmagnified size designated either in the caption or with a scale bar on the figure. Reduction for publication can make a magnification power designation (e.g., 100×) inappropriate.

Prepare legend to provide sufficient information and all abbreviations and symbols used in the figure should be defined in the legend.

### 13) USE OF NUMBERS

Follow the rules given below for writing numbers:

- (1) In general, spell out numbers one through nine and use numerals for 10 and above.
- (2) Use Arabic numerals with abbreviated units of measure: 2 g, 5 d, \$4.00, 3% and numerical designations in the text: exp 1, group 3, etc.
- (3) Use Arabic numerals to express time and date: 08:00 h, 3 Sept. 1985, etc.
- (4) In a series using some numbers less than 10 and some more than 10 use numerals for all (i.e. 2 Holsteins, 6 Charolais and 15 Friesians).
- (5) When writing a large number ending in several zeros, use a word for part of the number (i.e. 1.8 million rather than 1,800,000).
- (6) When two numbers appear adjacent to each other, spell out the first (i.e. ten 2-d-old chicks rather than 10 2-d-old chicks).
- (7) Do not begin a sentence with a numeral. Spell it out or rearrange the sentence.
- (8) Use the 24-h clock system: 09:30, 13:40 h, etc. Give day length in quantitative hours (e.g. 2 h 16 min). Abbreviate the terms hour (h), minute (min) second (s) and year (yr) when used with a number in the text but spell them out when they are used alone.
- (9) Do not use a hyphen to indicate inclusiveness (e.g. use 12 to 14 mg or wk 3 and 4 not 12-14 mg or wk 3-4).

Apêndice 6: Normas para a preparação de trabalhos científicos para a publicação na Animal Feed Science and technology.

### Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

*Original Research Papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Professor G. Flachowsky  
Federal Research Centre of Agriculture  
Institute of Animal Nutrition  
Bundesallee 50  
D-38116 Braunschweig  
Germany

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturers guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, wherein this information is not disclosed.

Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites.

Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement, may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

### **Contact details for submission**

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to [AuthorSupport@elsevier.com](mailto:AuthorSupport@elsevier.com). Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript.*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)*

*Supplemental files (where applicable)*

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Human and animal rights**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

### **Declaration of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.



## Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

## Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

## **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

**Elsevier supports responsible sharing**

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

**Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

**Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

**Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

**Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

**Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

**Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)**

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

**Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and

which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

### ***Elsevier Publishing Campus***

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit.

Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editors-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <https://www.evise.com/evise/jrn/ANIFEE>.

### ***Referees***

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

## Article Structure

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

### **Results**

Results should be clear and concise.

## Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

## Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

## Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Abstract

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

## Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

**Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

**Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

**Formatting of funding sources**

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

**Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical*

*Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.* All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or  $\leq 1.0$ . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is *only* used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent.

Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ . Isotope numbers should precede the symbols e.g.  $^{18}\text{O}$ . The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### ***Math formulae***

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If  $0.10 > P > 0.05$ , then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2.

Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around \* and /. In probability

expressions ( $P < 0.05$ ). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

## Artwork

### **Electronic artwork**

#### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

### **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and



other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

## Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

## References

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

### **Reference links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Data references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### **Reference management software**

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-feed-science-and-technology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### **Reference formatting**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the

year of publication;

2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).

Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List*: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples*:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in

the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Virtual Microscope**

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact [virtualmicroscope@elsevier.com](mailto:virtualmicroscope@elsevier.com) for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

### **Additional Information**

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer

questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### Apêndice 7- Morfometria pré-abate dos animais do experimento com extratos de plantas (cm)

Animais	Tratamento	A	B	C	D	E	F	G	H
1	4	8	71	61	64	64	65	15	21
2	2	8	83	62	64	66	65	18	21
3	3	9	83	67	68	72	72	20	21
4	2	9	90	67	69	62	64	13	21,5
5	1	9,5	92	71	72	69	65	16	24
6	4	8	89	67	66	66	65	16	18
7	3	8	85	54	58	60	61	15	18
8	1	9	88	54	59	64	64	19	19
9	4	8	91	60	62	64	60	15	18
10	1	8	88	56	58	65	63	15	17
11	3	8	93	58	59	74	68	22	16
12	2	9	90	65	64	66	67	17,5	18
13	4	9	98	59	62	61	62	21	18
14	1	9	85	59	60	59	58	13	17
15	3	9	84	62	64	63	63	15	19
16	2	9	96	63	64	54	54	15	17

A: Perímetro de canela, B: perímetro torácico, C: altura de cernelha, D: altura de garupa, E: comprimento corporal 1 (entre cola-cabeça), F: comprimento corporal 2 (cola-cabeça), G: largura entre-ancas, H: comprimento de garupa.

## VITA

Laion Antunes Stella, filho de Marco Marion Bresolin Stella e Elenir Antunes Stella, nascido em 30 de novembro de 1988, em Cruz Alta-RS. cursou o ensino fundamental na escola Ângelo Furian em Pejuçara-RS e o médio na escola Unicruz em Cruz Alta-RS. Em 2006 ingressou no curso de Zootecnia na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), campus Palmeira das Missões. Durante a graduação participou do grupo Gestão na Integração Produção Vegetal com Produção de Ruminantes. O trabalho de conclusão de curso era intitulado: Composição bromatológica de silagens de sorgo de plantas cultivadas com diferentes espaçamentos entrelinhas, sob orientação do Prof. Dr. João Pedro Velho. Formou-se em Zootecnia em janeiro de 2011.

Em abril de 2011 ingressou no curso de Mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob orientação do Prof. PhD Ênio Rosa Prates e co-orientação do Prof. Dr. Júlio Otávio Jardim Barcellos. A dissertação intitulava-se: Desempenho de cordeiros em pastagem estival suplementados com diferentes fontes proteicas. Obteve o título de mestre em março de 2013.

Em abril de 2013 ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob orientação do Prof. PhD Ênio Rosa Prates e co-orientação do Prof. Dr. Júlio Otávio Jardim Barcellos. A tese intitulava-se: Compostos de plantas como moduladores da fermentação ruminal em ovinos recebendo dieta com alto teor de concentrado. Obteve o título de doutor em março de 2017.