



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE ARAGUAÍNA
CURSO DE ZOOTECNIA

JOAO PEDRO GOMES RIBEIRO MARINHO

**ÓLEOS FUNCIONAIS COMO ADITIVO EM DIETAS DE ALTO GRÃO PARA
BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO–
PRODUÇÃO DE GASES *IN VITRO***

ARAGUAÍNA (TO)

2021

JOAO PEDRO GOMES RIBEIRO MARINHO

ÓLEOS FUNCIONAIS COMO ADITIVO EM DIETAS DE ALTO GRÃO PARA
BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO -
PRODUÇÃO DE GASES *IN VITRO*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à UFT – Universidade Federal
do Tocantins – Campus Universitário de
Araguaína para obtenção do Título de
Bacharel em Zootecnia, sob orientação do
Prof. Dr^a. Fabrícia Rocha Chaves Miotto

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabrícia Rocha
Chaves Miotto

ARAGUAÍNA (TO)

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M338♦ Marinho, Joao Pedro Gomes Ribeiro .
ÓLEOS FUNCIONAIS COMO ADITIVO EM DIETAS DE ALTO
GRÃO PARA BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO:
PRODUÇÃO DE GASES IN VITRO . / Joao Pedro Gomes Ribeiro
Marinho. – Araguaina, TO, 2021.
36 f.

Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins –
Câmpus Universitário de Araguaina - Curso de Zootecnia, 2021.

Orientadora : Fabrícia Rocha Chaves Miotto

1. Produção de gases. 2. dietas alto grão. 3. óleo de rícino. 4.
óleo da castanha de caju. I. Título

CDD 636

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de
qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que
citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime
estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da
UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**

JOAO PEDRO GOMES RIBEIRO MARINHO

ÓLEOS FUNCIONAIS COMO ADITIVO EM DIETAS DE ALTO GRÃO PARA
BOVINOS DE CORTE EM CONFINAMENTO-
PRODUÇÃO DE GASES *IN VITRO*

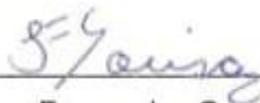
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à UFT – Universidade Federal do Tocantins – Campus Universitário de Araguaína, Curso de Zootecnia, foi avaliado para a obtenção do Título de Bacharel em Zootecnia e aprovado em sua forma final pelo Orientadora e pela Banca Examinadora.

Data de Aprovação: 13/12/2021

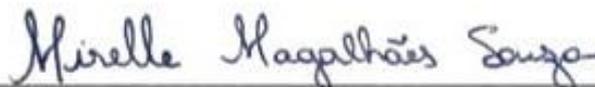
Banca examinadora:



Prof.ª Dr.ª. Fabrícia Rocha Chaves Miotto, UFT/UFNT



Prof. Dr. Luciano Fernandes Sousa, UFT/UFNT



M.Sc. Mirelle Magalhães Souza

Dedico este trabalho a todos os Agrônomos, Veterinários, Zootecnistas, professores e estudantes das Ciências Agrárias, que contribuem de alguma forma na produção animal, levando produtos e tecnologias sustentáveis para humanidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e ao meu Anjo da Guarda que ao todo longo da minha estiveram comigo, me protegendo, ensinando e confortando nos momentos mais difíceis e alegrando-se comigo nos momentos felizes da minha vida.

À minha família, Pedro Paulo Marinho (Pai), Joelma Marinho (Mãe), Paulo Vinícius Marinho (Irmão), Ana Vitória Marinho (Irmã), Vitoria Pereira Barcelo, Joelza (Tia) e Samuel (Primo) por todo apoio e subsídio para permanecer e concluir a graduação, sem todo o apoio deles eu não estaria aqui.

À Universidade Federal do Tocantins- UFT e Federal do Norte do Tocantins (UFNT), pelo apoio intelectual e estrutural durante o curso e pela concessão de bolsa de iniciação científica e auxílios financeiros para que alunos conquiste seus sonhos. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pela concessão de bolsas e financiamento às pesquisas.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Fabrícia Rocha Chaves Miotto, pelas orientações como bolsista de iniciação científica e agora no TCC, foram 3 anos de bastante aprendizado profissional e pessoal, nos quais eu levarei todos os ensinamentos para o resto da vida.

Ao Prof. Dr. Luciano Fernandes Sousa, coordenador do Laboratório de Produção de Gases, que prestou valiosas informações para a realização deste trabalho.

Todos os professores do Colegiado de Zootecnia da UFNT, por todos os ensinamentos.

Aos técnicos Josimar e Adriano, do Laboratório de Nutrição do PPGCAT- UFNT, por sanar minhas dúvidas e me auxiliarem nas análises.

À equipe do Laboratório de Fermentação Ruminal e Produção de Gases da UFNT, Araguaína: Amanda Fransozi, Murilo Saúde, Lívia Nepomuceno que foram meu braço direito na execução desse trabalho e aos demais da equipe, Laysa, Hyda Magna.

Aos meus colegas da minha turma “MATA BURRO”, por todo companheirismo.

Ao Oziel e “Valtinho”, pela ajuda no manejo dos animais doadores de inóculo.

À todas as pessoas que participaram diretamente na elaboração deste trabalho e que de alguma forma contribuíram para minha formação: Rafael Oliveira, Thays Matias, Justo Bernardo, Mirelle Magalhães, Luiza Carneiro, Ithalo Barros, Anderson, Daniel Henrique Tavares, Gabriel Furlaneto, Lays Barros, Saulo Henrique.

*“Eu aprendi qual é o valor que eu sonho alcançar
Eu entendi que o caminho pedras terá
Eu vi em campo aberto se erguer construção
E foi com muitas pedras, e foi com muitas mãos*

*Eu vi o meu limite vir diante de mim
Eu enfrentei batalhas que eu não venci
Mas o troféu não é de quem não fracassou
Eu tive muitas quedas, mas não fiquei no chão*

*E ao olhar pra trás, tudo que passou
Venho agradecer quem comigo estava
Ergo minhas mãos pra reconhecer*

*E hoje eu sou quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada
Eu abro o meu coração pra minha nova história*

*Vejo vitórias e hoje eu olho pra trás
E a minha frente eu sei existem muito mais, existem muito mais
Eu sei que minha jornada aqui só começou
Ao longo dessa estrada sozinho não estou*

*E ao olhar pra trás, tudo que passou
Venho agradecer quem comigo estava
Ergo minhas mãos pra reconhecer*

*E hoje eu sou quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada
Eu abro o meu coração pra minha nova história*

*E ao olhar pra trás, tudo que passou
Venho agradecer quem comigo estava
Ergo minhas mãos pra reconhecer*

*E hoje eu sou quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada
Eu abro o meu coração (pra minha nova história)*

*E hoje eu sou quem eu sou
Pois Sua mão me acompanhava
Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada
Eu abro o meu coração
Eu abro o meu coração
Nova história.”*

Canção “Só o começo”, Vocal Livre.

RESUMO

Objetivou-se com este ensaio avaliar a produção de gases ruminais *in vitro* de dietas alto grão com inclusão dos aditivos virginiamicina, óleo funcional Essential® composto por óleos funcionais de rícino e do líquido da castanha de caju e o consórcio do óleo funcional Essential® com a monensina para bovinos terminados em confinamento. Utilizou-se três vacas Girolando do Setor de Bovinocultura de Leite com pesos médio de 650 ± 100 kg como doadoras de inóculo, o inóculo adicional foi obtido pela mistura três inóculos. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizado (DBC), onde foram testadas as 4 dietas em 4 blocos (três animais doadores de inóculo mais um bloco adicional – mistura de três inóculos). Foram avaliadas dietas sem aditivo e dietas com a inclusão dos aditivos virginiamicina, óleo funcional (Essential®) e a associação do óleo funcional (Essential®) com monensina em dietas de alto grão para terminação de bovinos em confinamento e os seus efeitos sob a produção de gases *in vitro*. As medidas de pressão foram realizadas nos tempos 2; 4; 6; 9; 12; 16; 20; 24; 30; 36; 48; 72 e 96 horas. Pelo teste de paralelismo as dietas com aditivos foram paralelas ($p < 0,05$), somente as dietas com virginiamicina e óleo funcional com monensina foram idênticas ($p < 0,05$). A inclusão de virginiamicina e óleo funcional com monensina reduziu a produção totais de gases em relação aos tratamentos controle e óleo funcional, no entanto, a dieta com óleo funcional obteve produção total de gases próximas aos outros tratamentos com aditivos em relação ao controle. O tempo de colonização foi menor para as dietas sem aditivos e com óleo funcional. A taxa de degradação fracional (μ) aumentou com a inclusão dos aditivos virginiamicina, óleo funcional e óleo funcional com monensina em relação à dieta sem aditivo. A dieta controle apresentou degradabilidade efetiva com a taxa de passagem $8\% h^{-1}$ superior às dietas com aditivos, seguidas da dieta com óleo funcional, virginiamicina e óleo essencial + monensina que obteve menores valores de degradabilidade efetiva em relação à dieta controle. A dieta sem aditivos teve degradação de matéria seca em relação as dietas com aditivos virginiamicina, óleo funcional com monensina ($p < 0,05$), porém, quando comparou-se o tratamento óleo essencial com os outros tratamentos tiveram degradação de matéria seca semelhantes. A degradação de matéria orgânica foi semelhante para todos os tratamentos ($p > 0,05$). O uso do aditivo óleo funcional associado ou não com a monensina em dieta exclusivamente concentrada para bovinos terminados em confinamento promove degradação da matéria seca e orgânica semelhante a dieta com aditivo virginiamicina. O uso do aditivo óleo funcional em dieta de alto grão para bovinos terminados em confinamento reduz a produção cumulativa de gases *in vitro* em relação à dieta sem aditivo, no entanto, a associação com a monensina potencializa a redução na produção totais de gases, sendo semelhantes à dieta com virginiamicina. A degradação da matéria e orgânica *in vitro* é semelhante para as dietas com a inclusão dos aditivos virginiamicina e óleo funcional associado ou não à monensina.

Palavras-Chave: produção de gases, dietas alto grão, óleo de rícino, óleo da castanha de caju.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* production of rumen gases in high-grain diets with the inclusion of virginiamycin additives, Essential® functional oil composed of castor and cashew nut liquid functional oils and the consortium of Essential® functional oil with monensin for feedlot finished cattle. Three Girolando cows with average weight of 650 ± 100 kg were used as inoculum donors, the additional inoculum was obtained by mixing three inoculums. A randomized block design (RBD) was used, where the 4 diets were tested in 4 blocks (3 inoculum donor animals plus an additional block – mixture of three inoculums). Diets without additive and diets with the inclusion of the additives virginiamycin, functional oil (Essential®) and the association of functional oil (Essential®) with monensin in high-grain diets for feedlot finishing cattle and their effects on ruminal gases production were evaluated *in vitro*. Pressure measurements were performed at times 2, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 72 and 96 hours. By the parallelism test, the diets with additives were parallel ($p < 0.05$), only the diets with virginiamycin and functional oil with monensin were identical ($p < 0.05$). The inclusion of virginiamycin and functional oil with monensin reduced the total production of gases in relation to the control and functional oil treatments, however the diet with functional oil obtained similar total production of gases to the other treatments with additives in relation to the control. Colonization time was shorter for diets without additives and with functional oil. The fractional degradation rate (μ) increased with the inclusion of the additives virginiamycin, functional oil and functional oil with monensin in relation to the diet without additive. The control diet showed effective degradability with a passage rate $8\% \text{ h}^{-1}$ higher than the diets with additives, followed by the diet with functional oil, virginiamycin and essential oil + monensin, which had lower values of effective degradability compared to the control diet. The diet without additives had dry matter degradation in relation to diets with virginiamycin additives, functional oil with monensin ($p < 0.05$), however, when the essential oil treatment was compared with the other treatments, they had similar dry matter degradation. Organic matter degradability was similar for all treatments ($p > 0.05$). The use of the functional oil additive associated or not with monensin in an exclusively concentrated diet for feedlot-finished cattle promotes degradation of dry and organic matter similar to the diet with virginiamycin additive. The use of the functional oil additive in a high-grain diet for feedlot-finished cattle reduces the cumulative production of gases *in vitro* in relation to the diet without additive, however, the association with monensin potentiates the reduction in the total production of gases, being similar to the diet with virginiamycin. The degradation of matter and organic *in vitro* is similar for diets with the inclusion of the additives virginiamycin and functional oil associated or not with monensina.

Keywords: gas production, high grain diets, castor oil, cashew nut oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Mecanismos de ação dos óleos funcionais em microrganismo Gram-positivos.....	22
Figura 2- Principais constituintes do líquido da castanha de caju	23
Figura 3- Estrutura do triglicerídeo do ácido ricinoléico	23
Figura 4- Curvas da produção cumulativa de gases em função do tempo de incubação.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição bromatológica dos ingredientes experimentais.....	25
Tabela 2- Proporção dos ingredientes e composição química das dietas.....	25
Tabela 3- Equações da produção cumulativa de gases expressas em mLg ⁻¹ de MS de dietas alto grão com diferentes aditivos.....	29
Tabela 4- Parâmetros da cinética de fermentação ruminal <i>in vitro</i> de dietas com diferentes aditivos utilizando o modelo de France e degradabilidade efetiva.....	31
Tabela 5- Degradação da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO) em dietas de alto grão com diferentes aditivos.....	32

LISTA DE SIGLAS

MS	Matéria seca
PB	Proteína bruta
EE	Extrato etéreo
FDN	Fibra em detergente neutro
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
CNF	Carboidratos não fibrosos
CT	Carboidratos totais
NH ₃	Amônia
H ⁺	Hidrogênio
K ⁺	Potássio
LCC	Líquido da castanha de caju
N	Nitrogênio
ssp	Espécies
DBC	Delineamento em blocos casualizado
pH	Potencial hidrogeniônico
A	Produção total de gases
Y	Produção cumulativa de gases
DE	Degradabilidade efetiva
DMO	Degradação da matéria orgânica
DMS	Degradação da matéria seca
R ²	Coefficiente de determinação
μ	Taxa de degradação fracional
N-NH ₃	Nitrogênio amoniacal
<i>Psi</i>	Pressão

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos Gerais.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 O que são aditivos ionóforos e não ionóforos e suas influências sob a fermentação ruminal	16
3.2 Aditivo ionóforo monensina	18
3.3 Aditivo não-ionóforo virginiamicina.....	19
3.4 Óleos funcionais.....	21
3.4.1 Óleo do líquido da castanha de caju e rícino como aditivo na alimentação de ruminantes	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	33

1 INTRODUÇÃO

No Brasil cerca de 6,48 milhões de bovinos abatidos foram terminados em confinamento no ano de 2020, o equivalente a 15,62% do abate total (ABIEC, 2021). O sistema de terminação em confinamento é uma estratégia para maximizar a produção bovina, reduzir o tempo de abate, e melhorar a qualidade de carcaça e da carne (BICALHO et al., 2014; KUZZ et al., 2010).

Melhores desempenhos são conseguidos em sistemas de confinamento em função da maior participação de alimentos concentrados, substratos mais digestíveis e por isso mais energéticos. As dietas com alto teor de concentrado, a partir de 80% de concentrado, em especial aquelas exclusivamente com concentrados, são desafiadoras ao ambiente ruminal, podendo levar a distúrbios metabólicos, conseqüentemente, a prejuízos ao desempenho dos animais (SANTOS, 2006).

O uso de aditivos moduladores da fermentação ruminal, seja eles ionóforos ou não ionóforos, tem por objetivo reduzir populações de arqueobactérias, responsáveis pela produção de metano, bactérias Gram-positivas, responsáveis pela produção de lactato, minimizando as perdas de energia via metano e a redução do pH ruminal, pois o aumento de carboidratos prontamente fermentáveis no rúmen pode ocasionar acidose ruminal. Um exemplo de ionóforo é a monensina sódica que causa alterações na membrana plasmática de arqueobactérias metanogênicas e bactérias Gram-positivas (MORAIS, et al., 2006; SITTA, 2011) e antibiótico não ionóforo é a virginiamicina que interfere na síntese proteica de arqueobactérias metanogênicas e bactérias Gram-positivas (SITTA, 2011).

Mesmo que por mecanismos de ação diferentes, a utilização tanto de monensina, quanto virginiamicina traz os mesmos benefícios ao animal, melhora a degradabilidade da dieta no rúmen, inibi as arqueas metanogênicas, conseqüentemente, reduz a produção de metano entérico, havendo assim menos perdas de energia, reduz a relação acetato: propionato, impede a queda abrupta do pH ruminal, pois há redução na população de bactérias produtoras de lactato, melhor utilização das proteínas e redução do N-amoniaco no rúmen devido à sensibilidade das bactérias proteolíticas a esses aditivos. (CHAGAS, 2015; GUO et al., 2010)

Contudo, países da União Europeia vêm restringindo as importações de carnes de países que fazem uso desses produtos nas dietas de animais de produção, motivados por possíveis danos à saúde animal e pública, como possível aumento da

resistência dos microrganismos a esses antibióticos, o que prejudicaria seu uso no tratamento humano (SOUZA, 2018).

Diante desses fatos, estudos que tem por objetivo apontar produtos moduladores de fermentação ruminal alternativos vem sendo desenvolvidos (GARCIA et al., 2020; PEREIRA et al., 2019; VÉLEZ-TERRANOVA et al., 2014). Uma alternativa é o uso de aditivos de origem vegetal, como os óleos funcionais que podem ser incluídos nas dietas de bovinos como formas de substituição aos antibióticos (GARCIA et al., 2020; FERRO, et al., 2016; VELEZ-TERRANOVA et al., 2014).

Os óleos funcionais são substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas, por possuírem propriedades antimicrobianas, são considerados como ionóforos monovalentes e polivalentes, nos quais atuam nas arqueobactérias metanogênicas e bactérias gram-positivas (SCHELLING, 1984). Estes produtos são utilizados em fitoterapias e na alimentação humana, havendo aceitação por mercados mais rigorosos (FERRO et al., 2016; VÉLEZ-TERRANOVA et al., 2014).

O Essential® é um produto aditivo composto por óleos funcionais a base de óleo de rícino e o óleo do líquido da castanha de caju, tendo como seus compostos ativos o ácido cardol, cardanol e ácido ricinoléico. Kolling et al (2018) estudando o óleo de orégano observou redução na produção de metano entérico, que é um gás importante nas mudanças climáticas (BENCHAAR; GREATHEAD, 2011), havendo menores perdas de energia dietética, pois o metano é responsável por cerca 2 a 12% na perda dessa energia (JOHNSON et al., 1995).

Dessa maneira, estudos que avaliem o uso de óleos funcional como alternativa aos aditivos antibióticos convencionais em dietas de bovinos, em especial dietas de alto grão, são fundamentais para subsidiar sua aplicação e confirmar seus benefícios. Para tanto, o uso da técnica de avaliação da produção de gases e degradação *in vitro* são importantes por permitir respostas rápidas, testar vários tratamentos e ter baixo custo.

A hipótese deste trabalho é que o uso óleo funcional Essential® composto por óleos funcionais de rícino e do líquido da castanha de caju em substituição à aditivos convencionais ou seu uso combinado em dietas exclusivamente de grãos, formulada para a terminação de bovinos em confinamento, permitirá semelhante produção de gases e não alterará a degradabilidade da matéria seca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Objetivou-se avaliar a produção de gases e degradação da matéria seca de dietas alto grão com uso dos aditivos virginiamicina, aditivo de óleos funcionais Essential® e a associação dos óleos funcionais Essential® com o ionóforo monensina para bovinos terminados em confinamento.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros de fermentação ruminal após 96 horas de incubação de dietas alto grão sem e com aditivos moduladores de fermentação ruminal para bovinos terminados em confinamento pela técnica *in vitro*;
- Determinar os efeitos do aditivo de óleos funcionais Essential® e a associação dos óleos funcionais Essential® com ionóforo monensina sobre a degradação da matéria seca de dietas exclusivamente de concentrado para terminação de bovinos pela técnica *in vitro*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O que são aditivos ionóforos e não ionóforos e suas influências sob a fermentação ruminal

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento da República Federativa do Brasil define aditivo como:

“(...) substância, micro-organismos ou produto formulado, adicionado intencionalmente, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais” (MAPA, 2015, p. 1).

Sendo classificados como aditivos tecnológicos (adsorvente de odor, regulador de acidez, conservante, estabilizantes, emulsificantes), aditivos sensoriais (aromatizante, corante, pigmentante, edulcorante, palatabilizante), aditivos nutricionais, aditivos zootécnicos (acidificantes, enzimáticos, prebiótico, melhoradores de desempenho e probióticos) (MAPA, 2020).

Os principais ionóforos utilizados no Brasil são: monensina (*S. cinnamomene*), lasalocida (*S. lasaliensis*), salinomina (*S. albus*), narasina (*S. aureofaciens*). (SALMAN et al., 2006).

Conforme o seu modo de ação, os antibióticos podem ser divididos em duas classes: os ionóforos e não ionóforos. Os aditivos ionóforos são aditivos zotécnicos produzidos a partir da fermentação de microrganismos (*Streptomyces* spp.) e seu modo de ação é caracterizado por alterar a permeabilidade da membrana plasmática de arqueas metanogênicas e bactérias Gram-positivas. Os antibióticos não ionóforos, como por exemplo, a virginamicina atuam na inibição da síntese proteica das arqueas metanogênicas e bactérias Gram-positivas (SITTA, 2011). As bactérias em geral são classificadas como: Gram-positivas e Gram-negativas, as Gram-positivas possuem somente um envoltório celular tornando-as mais sensíveis, enquanto as gram-negativas possuem duas membranas, uma interna e outra externas, mais resistentes aos antibióticos ionóforos (OLIVEIRA et al., 2019). No entanto, as arqueobactérias pertence ao domínio Archaeae, se diferenciam das bactérias devido à ausência de peptidoglicanos na sua membrana plasmática (PAULA et al., 2018)

São sensíveis aos ionóforos e não ionóforos as bactérias Gram-positivas e arqueas metanogênicas (FONSECA, 2012):

- *Clostridium* e *Peptostreptococcus*, responsáveis pela produção de amônia (NH₃);
- *Streptococcus* e *Lactobacillus*, produtoras de lactato;
- *Butyrivibrio*, *Ruminococcus* e *Fibrobacter*, ácido acético e butírico;
- *Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanomicrobium* spp. que são produtoras de metano (arqueas metanogênicas).

As bactérias Gram-negativas são resistentes aos antibióticos ionóforos e não ionóforos, esses microrganismos são responsáveis pela maior parte da produção do ácido propiônico, como por exemplo as *Bacterioides*, *Selenomonas* e *Veillonella*. As *Anaerovibrio*, *Megasfera* e *Selenomonas* que utilizam lactato (FONSECA, 2012).

Algumas das modificações observadas pelo uso de aditivos moduladores do crescimento microbiano no rúmen são, redução da produção de lactato, aumento da produção de propionato e redução da relação acetato: propionato. O aumento da produção de propionato no rúmen é desejável, já que o mesmo é precursor da via gliconeogênese nos animais ruminantes, pois o animal precisa de um maior aporte de

glicose disponível para maximizar a produção de carne ou leite (SANTOS, 2013). A redução na produção de lactato é uma forma de evitar maiores flutuações no pH ruminal e evitar os distúrbios metabólicos (SANTOS, 2006).

Os aditivos moduladores de ambiente ruminal são uma ferramenta essencial, quando administrada em doses controladas, em dietas com alto teor de concentrado para a máxima eficiência produtiva, melhorando a conversão alimentar, ganho de peso, mitigação de gases de efeito estufa, devido à redução das populações metanogênicas (OLIVEIRA, 2019; CHAGAS, 2015).

3.2 Aditivo ionóforo monensina

A monensina é um poliéster carboxílico produzido por bactérias *Streptomyces cinnamomonesis* (SALMAN et al., 2006). Sua atuação ocorre na membrana plasmática das arqueas metanogênicas e bactérias Gram-positivas, causando a solubilização da membrana plasmática e alterações no meio intracelular da célula bacteriana, no qual aumenta a concentração de prótons H^+ reduzindo o pH intracelular e retira cátions K^+ do meio intracelular para o extracelular dos microrganismos ruminais, para a célula manter a homeostase há gasto de energia, reduzindo assim a multiplicação e a ineficiência dos processos homeostáticos, assim aumenta a osmolaridade intracelular e ocorre o extravasamento, conseqüentemente a lise da célula (MORAIS et al., 2006; SALMAN et al., 2006; SITTA, 2011).

Devido à sua capacidade antimicrobiana, a monensina quando adicionada nas dietas de ruminantes modula os parâmetros ruminais, reduzindo a proporção acetato: propionato, devido à sensibilidade das bactérias Gram-positivas produtoras de acetato, butirato, formato e hidrogênio, há redução na produção desses substratos. As Gram-negativas que produzem succinato, possuem maior resistência a esse ionóforo com isso haverá maior aporte de substratos para a produção de glicose, sendo que o propionato é o principal precursor da via gliconeogênese em ruminantes, reduz a produção de metano entérico (OLIVEIRA et al., 2019; SALMAN, 2006; SCHELLING, 1984), além de reduzir as taxas de deaminação e a produção de amônia (NARVAEZ et al., 2013).

Shen et al (2017) observou a redução na produção totais de gases e metano *in vitro* com a utilização da monensina (5 μ M), com redução de 50,9 mL (produção total) e 9 mL (metano) a menos que o tratamento controle.

Lana e Russell (2001) estudando os efeitos dos níveis de monensina na fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos em dietas com alto teor de volumoso ou concentrado, nos níveis de concentração de 0 a 10 μM de monensina, observou-se que houve menor produção de metano na dieta com alto teor de concentrado em relação a dietas exclusivamente de volumoso, com maior produção de metano. Menores produções totais em 24 horas de AGV em dieta com concentrado em relação com a dieta exclusivamente de volumosos com a administração de concentrações crescentes de monensina sendo as médias 64 e 72 μM , respectivamente. No entanto, houve declínio na relação acetato: propionato ao aumenta-se as doses de monensina, passando de 3,8 para 2,4 na dieta 100% de volumoso e 1,75 para 1,25 na dieta de 90% de concentrado. Verificou-se que os animais alimentados com as dietas 100% volumosa mantiveram o pH constante, em média 6,7, com 130 μM e relação concentração de AGV, porém os animais que consumiram a dieta com 90% de concentrado, duas a três horas após o consumo houve variação de 6,2 a 5,5.

Safaei et al (2014) avaliando dieta com os níveis de monensina de 0, 10, 20 e 30 $\text{mg kg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ em dieta de alto concentrado (proporção volumoso: concentrado de 20:80) para cordeiros Gezhel observou que houve aumento no pH ruminal com o aumento das doses de monensina na dieta, onde as doses de 20 e 30 $\text{mg kg}^{-1} \text{MS}^{-1}$ apresentaram os maiores pH médio correspondente a 6,25 e 6,38, respectivamente.

Ogunade et al (2018) investigando as alterações da monensina suplementada ou não a 200 mg dia^{-1} sob as populações de microrganismos ruminal e o perfil metabólico ruminal de bovinos, observaram que a relação acetato reduziu com a suplementação com monensina, em média 52,3 μM , quando se comparou com o controle (60 μM), as concentrações de propionato aumentaram (27,5 μM) com a monensina e 23,3 μM em comparação ao controle, resultados que foram devido à redução de bactérias produtoras de acetato do gênero *Streptococcus* e o aumento de *Propionispira*, grandes produtoras de ácido propiônico, *Hallella* que descarboxila o succinato para produzir o propionato. Observou-se no mesmo estudo que a as populações de Archea do gênero *Methanobacterium* reduziram com a suplementação de monensina para bovinos.

Segundo o mesmo autor o que possivelmente ocorreu foi a redução de microrganismos responsáveis pelo fornecimento de substratos (formato e H_2) para a

produção de metano, no entanto, uma alteração na cinética de crescimento das metanogênicas de forma indireta e não afetando-as diretamente, corroborando com (NARVAEZ et al., 2013) que observaram o mesmo efeito.

3.3 Aditivo não-ionóforo virginiamicina

A virginiamicina é uma molécula formada por peptídeos denominados fator M e fator S sintetizado por *Streptomyces virginiae*, seu mecanismo de ação é caracterizado por inibir a síntese proteica de arqueas e bactérias Gram-positivas, em que os fatores M e S atuam em conjunto na subunidade ribossômica 30S suprimindo as ligações peptídicas, conseqüentemente, impedindo a síntese proteica na bactéria, provocando desequilíbrio dos processos metabólicos dos microrganismos, causando redução na multiplicação e lise da célula (COCITO, 1979; OLIVEIRA, et al., 2019; SITTA, 2011).

Mesmo com mecanismo de ação diferentes aos dos ionóforos, a virginiamicina promove os mesmos benefícios aos ruminantes que os ionóforos. Coe et al., (1999), Chagas (2015) e Guo et al., (2010) relataram que a virginiamicina inibi as arqueas metanogênicas reduzindo a produção de metano entérico, melhorando a digestibilidade e reduzindo as perdas de energia pela eructação, urina e fezes, diminui a proporção acetato: propionato, impede a queda abrupta do pH ruminal, pois há redução na população de bactérias produtoras de lactato, melhor utilização das proteínas e redução do N-amoniaco no rúmen devido à sensibilidade das bactérias proteolíticas à esse composto.

Coe et al (1999) comparando os efeitos da virginiamicina nos níveis de (0, 175 e 250 mg/ animal/dia) e monensina/ tilosina (na proporção de 250 /90 mg/ animal/dia) na fermentação ruminal produtos e populações microbianas em novilhos canulados Holstein durante adaptação a uma dieta totalmente concentrada, observaram que a virginiamicina controlou o crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico em relação aos outros tratamentos, demonstrando assim o seu potencial em modular a fermentação ruminal em situações de mudanças abruptas na dieta. Podendo minimizar a ocorrência de acidose ruminal, abscessos no fígado e laminites.

Oliveira et al (2017) ao avaliarem os efeitos das doses 0, 25 e 34 ppm de virginiamicina na redução da acidose láctica ruminal induzida em bovinos consumindo dieta com 75% de concentrado e 15 % de volumoso, observou-se que no tratamento

sem o aditivo apresentou quadro de acidose aguda, ocasionada pelas altas concentrações de lactato, em média 71 μM , o que certamente contribuiu para a redução do pH ruminal (4,04) nesse estudo. Em relação ao tratamento a dose 25 ppm de virginiamicina reduziu o lactato cerca de 14,4%.

Moreira et al (2018) em estudo *in vitro*, verificou que a virginiamicina nos níveis 5, 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ alterou alguns parâmetros de fermentação ruminal, como a produção total de gases que reduziu em relação à dieta sem virginiamicina, com médias 18,08; 13,41 e 15,16 mL para os níveis 5, 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A menor relação acetato: propionato com o uso de virginiamicina, com médias 2,80 (5 $\mu\text{mol L}^{-1}$); 2,53 (10 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 2,60 mmol l^{-1} (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em relação ao controle (3,34 mmol l^{-1}). Essa relação reduziu devido ao aumento de 21,26; 23,67 e 23, 26 mmol l^{-1} de propionato nas doses de 5; 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de virginiamicina, respectivamente.

3.4 Óleos funcionais

O uso de antibióticos ionóforos e não ionóforos desde 2006 têm sofridos restrições impostas por países da União Europeia quanto o uso na alimentação de ruminantes (CALSAMIGLIA et al., 2007, apud EUROPEAN COMMISSION, 2003), preocupados com aumento de resistência dos microrganismos a esses antibióticos, toxicidade e o resíduos dessas substancias na carne ou leite.

Com isso, busca-se alternativas que substituam o uso de aditivos ionóforos e não ionóforos na alimentação de ruminantes. Como forma de contornar tais questões, pesquisadores vem buscando soluções alternativas, uma delas é a suplementação com óleos funcionais, pois tem caráter antibiótico (OLIVEIRA, 2019; VÉLEZ-TERRANOVA et al., 2014).

Os organismos vegetais produzem compostos do metabolismo secundário que atuam na proteção da planta contra predadores, microrganismo patogênicos, além de possuírem a capacidade de exalar odores no meio ambiente para atrair animais polinizadores e propagadores de sementes, essas substâncias são denominadas de óleos funcionais, óleos essenciais, saponinas e taninos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os óleos funcionais possuem propriedades antimicrobianas, antioxidante, antifúngico, anti-inflamatória, aromáticas e conservante (BURT, 2004), e são extraídos de diferentes componentes morfológicos das plantas, como: folha, caule, raízes e frutos. Os principais métodos de extração são a vapor ou solventes (ARAUJO, 2010).

Os mecanismos antimicrobianos dos óleos funcionais ainda não são bem compreendidos, devido à variedade de substâncias químicas contidas nos óleos funcionais, com isso, podendo ter mais de um princípio ativo, onde atuam de forma sinérgica potencializando a atividade antimicrobiana, em que as arqueas metanogênicas e bactérias Gram-positiva são mais sensíveis a esses compostos. Os óleos atuam causando danos na membrana plasmática, proteínas da membrana, extravasamento e coagulação do conteúdo celular e depleção da bomba de próton (BURT, 2004; CHAGAS, 2015), Figura 1.

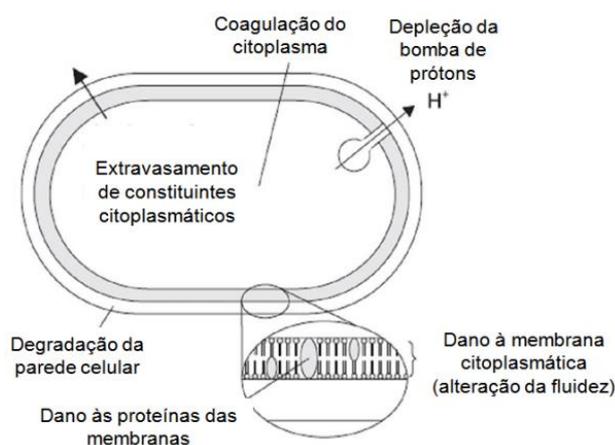


Figura 1- Representação dos mecanismos de ação dos óleos funcionais em microrganismo gram-positivos.

Fonte: Burt (2004).

Estudos indicam que os óleos funcionais reduzem a taxa de produção de amônia, melhoram a digestibilidade, conseqüentemente, a absorção dos nutrientes, também reduzem a taxa de deaminação de aminoácidos, demonstrando potencial para potencial substituto aos aditivos convencionais (BENCHAR et al. 2008; CHAGAS, 2015; FERRO et al., 2016).

3.4.1 Óleo do líquido da castanha de caju e rícino como aditivo na alimentação de ruminantes

O líquido da castanha de caju é oriundo do fruto do cajueiro (*Anacardium occidentale L.*), sendo uma importante espécie vegetal para a socioeconômica do Brasil, principalmente na região nordeste onde se encontra maior parte da produção.

O líquido da castanha de caju é um subproduto extraído do beneficiamento da castanha de caju, extraído a frio, por solvente ou processo térmico mecânico, em sua composição encontra-se o ácido anacárdico, cardol, cardanol, que são os seus princípios ativos (ARAUJO, 2010; CHAGAS, 2015; DÍAZ, 2013; SANTOS, 2013), Figura 2. Há diversas aplicações nas indústrias de fármacos, cosméticos, antioxidantes, inseticidas, fungicidas e fabricação de tintas. Os lipídios fenólicos possuem atividade antibacteriana e podem ser utilizados como modulador de fermentação ruminal, atuando principalmente nas bactérias gram-positivas (DÍAZ, 2013).

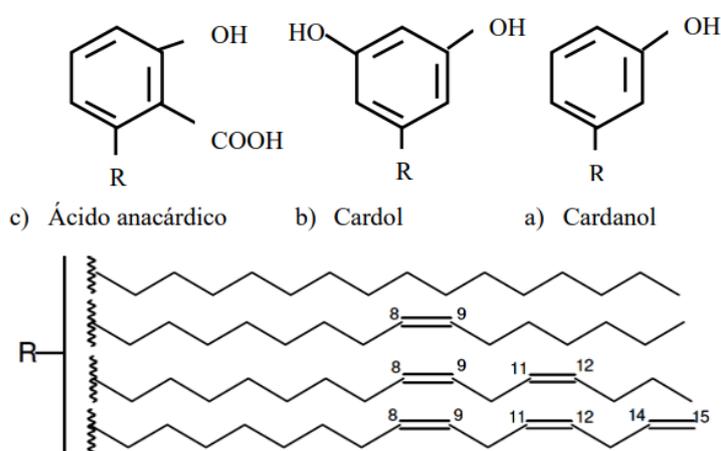


Figura 2- Principais constituintes do líquido da castanha de caju.

Fonte: OLIVEIRA et al. (2011)

Óleo de rícino é extraído da mamona (*Ricinus communis L.*), em que seu princípio ativo é o triglicerídeo de ácido ricinoléico (Figura 3), devido as suas instaurações, essa molécula apresenta maior efetividade no controle de populações de bactérias, leveduras e fungos (SANTOS, 2013). Devido as suas características é usado nas indústrias de fármacos, cosméticos, médica e na nutrição animal.

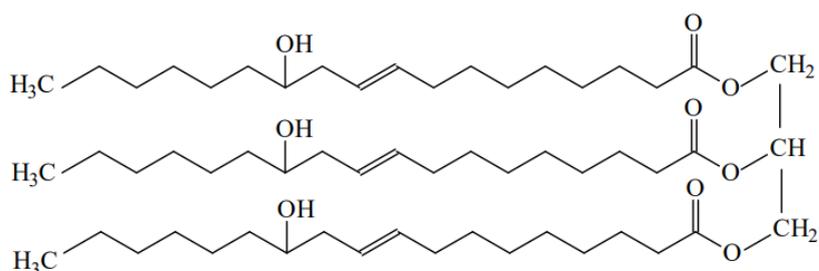


Figura 3- Estrutura do triglicerídeo do ácido ricinoléico

Fonte: CANGEMI (2006).

Chagas (2015) avaliando o desempenho e metabolismo ruminal de bovinos Nelore em terminação alimentados com dietas ricas em milho moído, suplementados com óleos funcionais do líquido da castanha de caju e óleo de rícino (Essential®) em combinação com monensina ou sem monensina, nos níveis 0; 30 mg⁻¹ kg⁻¹ MS⁻¹ de monensina; 300 e 500 mg⁻¹ kg⁻¹ MS⁻¹ de Essential® observou que após os 21 dias a suplementação com óleo funcional, aumentou a eficiência alimentar, ganho de peso diário, consumo de matéria seca das dietas com óleos funcionais em comparação a com inclusão de monensina. Entretanto, após os 124 dias dos animais confinados, somente foi observado diferença no consumo de matéria seca, que foi menor na dieta com monensina em comparação com o óleo funcional.

Díaz (2013) estudando os efeitos de níveis crescentes de líquido da castanha de caju (LCC) nos níveis de 0; 0,3; 0,6 e 1,2 g LCC⁻¹ kg⁻¹ MS em dietas para ruminantes e seus efeitos sob a digestibilidade *in vitro* da matéria seca e parâmetros da fermentação ruminal, concentração de N-amoniaco (N-NH₃) e pH *in vitro*, observou-se que a digestibilidade da matéria seca é melhorada com a inclusão de 0,5 g de líquido da castanha de caju. A adição de líquido de castanha de caju na alimentação de ruminantes reduz a produção de amônia, evita queda de pH ruminal de forma drástica, reduzindo as ocorrências de distúrbios metabólicos (DÍAZ, 2013).

4 MATERIAIS E METÓDOS

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT) sob o protocolo nº 23101.002095/2020-15.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fermentação Ruminal e Produção de Gases e as análises bromatológicas no Laboratório de Bromatológica, ambos do Complexo Laboratorial de Nutrição Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal Tropical, situados na Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ) da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), em Araguaína Tocantins, localizada a 07°12'28" latitude sul e 48°12'26" longitude oeste.

O período experimental consistiu em onze dias em que seis dias foram destinados à adaptação dos animais e preparação das dietas, o ensaio de produção de gases *in vitro* teve duração de cinco dias.

Avaliou-se o uso de diferentes aditivos moduladores do crescimento dos microrganismos ruminais na dieta de alto grão (virginiamicina, óleo funcional e óleo funcional mais monensina), sem volumoso, para a terminação de bovinos em confinamento pela técnica *in vitro*, com uso da técnica semi-automática de produção de gases, segundo a metodologia de Maurício et al. (1999).

O delineamento experimental foi em bloco casualizado (DBC) com três blocos mais um bloco adicional, do pool dos inóculos de três animais, perfazendo quartos blocos, quatro tratamentos, onde cada tratamento teve três réplicas por bloco. Sendo os tratamentos:

Tratamento 1- Controle: dieta sem aditivo;

Tratamento 2- Virginiamicina: dieta contendo o aditivo virginiamicina, V-MAX®-Phibro, 150 mg kg⁻¹.

Tratamento 3- Óleo funcional: dieta contendo óleos funcionais, Essential® - óleo funcional da Oligo Basiscs®, composto de óleo de rícino e óleo do líquido da casca de caju a 3 g kg⁻¹.

Tratamento 4 - Óleo funcional + monensina: dieta contendo óleo funcional, Essential® a 3 g kg⁻¹, mais monensina, Rumensin®- Elanco, a 120 mg kg⁻¹.

As dietas estudadas foram previamente secas em estufa de ventilação forçada por 72 horas à 55 ° C e, posteriormente, moídas a 2 mm para utilização no ensaio de produção de gases e a 1 mm para análises bromatológica. AS amostras foram moídas em moinho de facas tipo willey e em seguida foram avaliados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) (AOAC, 2005), fibra em detergente neutro (FDN) (VAN SOEST et al., 1991). Carboidratos não-fibrosos pela equação: %CNF = 100 – (%PB + %EE + %MM + %FDN), (SNIFFEN et al., 1992).

Na Tabela 1 estão os dados de composição bromatológica dos ingredientes das dietas. Na Tabela 2 estão as proporções dos ingredientes nas dietas e composição bromatológica das dietas experimentais.

Tabela 1- Composição química dos ingredientes experimentais

g kg ⁻¹ de MS	Ingredientes					
	Milho	Farelo de soja	Núcleo virginiamicina ¹	Núcleo óleo funcional ²	Núcleo óleo funcional+ monensina ³	Suplemento mineral vitamínico ⁴
MS (g kg ⁻¹ de MN)	895,9	872,9	896,7	909,6	835,9	912,9
PB	76,6	453,9	342,8	353,0	362,9	-
EE	48,3	33,5	23,7	28,3	24,8	-
FDN	125,8	135,1	305,3	254,5	263,5	-
MM	16,7	74,0	238,4	234,2	233,0	891,8

¹Núcleo peletizado com virginiamicina (V-MAX®- Phibro); ²Núcleo peletizado com óleo funcional (Essential®- Oligobasics) contendo óleos de rícino e caju (cardanol, ácido ricinoléico e cardol); ³Núcleo peletizado com óleo funcional + monensina sódica (Rumensin®- Elanco). ⁴Suplemento mineral vitamínico (80P® - Agrocria).

Tabela 2- Proporção dos ingredientes e composição bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes	Tratamentos			
	Controle	Virginiamicina ¹	Óleo funcional ²	Óleo funcional+ monensina ³
Milho	84%	85%	85%	85%
Núcleo Virginiamicina	-	15%	-	-
Núcleo Óleo funcional	-	-	15%	-
Núcleo Óleo funcional+ monesina	-	-	-	15%
Farelo de soja	13%	-	-	-
Suplemento mineral vitamínico	3%	-	-	-

g kg ⁻¹ de MS	Composição bromatológica			
	Controle	Virginiamicina ¹	Óleo funcional ²	Óleo funcional+ monensina ³
Matéria seca (g kg ⁻¹ de MN)	877,4	879,5	874,6	868,4
Proteína bruta	123,4	139,2	138,9	138,8
Extrato etéreo	48,3	50,7	47,8	55,1
Fibra em detergente neutro	123,3	112,8	121,6	112,5
Matéria mineral	47,4	50,5	47,6	45,8
Carboidratos não fibrosos	657,6	646,8	644,1	647,8

¹Núcleo peletizado com virginiamicina (V-MAX®- Phibro); ²Núcleo peletizado com óleo funcional (Essential®- Oligobasics) contendo óleos de rícino e caju (cardanol, ácido ricinoléico e cardol); ³Núcleo peletizado com óleo funcional + monensina sódica (Rumensin®- Elanco). ⁴Suplemento mineral vitamínico (80P® - Agrocria).

Os animais doadores de inóculo foram três vacas leiteiras da raça Girolando do Setor de Bovinocultura Leiteira da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFNT, com peso vivo médio inicial de 750 ± 115 kg de peso vivo. Os animais doadores de inóculo foram suplementados a pasto com 1,5 kg de concentrado até ao sexto dia após o início da adaptação. Obteve-se os inóculos via esôfago com o auxílio de sonda

esofagiana acoplada um recipiente de vidro conectado à um cano ligado à bomba de vácuo. Todos os recipientes que tiveram contato com inóculo estavam aquecidos à 39 °C (temperatura do rúmen) para que não ocorresse a lise das populações de microrganismos ruminais. Um pool dos três inóculos foram misturados para formar um bloco adicional.

Frascos de 150 ml utilizados foram lavados com água destilada e secos em estufa de ventilação forçada à 55 °C e a estes adicionou-se 1,0 g de amostra do substrato, nos quais foram aspergidos CO₂ no interior de cada frasco. Com o intuito de controlar as variações, foram incubados frascos considerados branco, que continham as soluções de incubação sem o substrato. Colocou-se 90 ml de meio de cultura proposto por Theodorou et al. (1994) e 10 ml de inóculo. Utilizou-se três réplicas de cada tratamento por bloco. Os frascos foram vedados com tampa de silicone e incubados em estufa a 39 °C, sob controle rigoroso de temperatura. Para a mensuração da pressão dos gases no interior do frasco, utilizou-se um transdutor de pressão modelo DPI800-P conectado a válvula com três saídas, uma saída foi acoplada ao transdutor de pressão, outra à uma agulha (0,8 x 25,0 mm) que tem acesso aos gases no interior dos frascos e a outra foi vedada. As leituras foram realizadas nos tempos 2; 4; 6; 9; 12; 16; 20; 24; 30; 36; 48; 72 e 96 horas após o início do processo de fermentação.

Utilizou-se os dados de pressão para a determinação do volume de gases pela equação de predição de volume de gases proposta por Feitosa e Sousa (2020):

$$V = -0,0195 + 3,7989P + 0,0174P^2$$

Em que: V= volume; P= pressão.

Ao término das medições no tempo 96 horas, os frascos foram mergulhados em um recipiente com água gelada para cessar o processo fermentativo. Os materiais sólidos e líquido do interior dos frascos foram filtrados em cadinhos filtrantes, com porosidade 1, com o auxílio utilizando-se uma bomba de vácuo, e levados à estufa à 105 °C por 24 horas, resfriados em dessecador por 30 minutos, e pesados para determinar a degradabilidade da matéria seca. Após pesados, foram colocados na mufla durante 4 horas à 400 °C, consecutivamente pesados para determinação da matéria orgânica.

O modelo de France et al. (1993) foi ajustado aos dados da cinética de produção de gases, como expresso abaixo:

$$Y = A \{1 - \exp[-b(t-L) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L})]\}$$

Em que, Y = produção acumulativa de gases (ml); A = máxima de produção acumulada de gases (ml); L = tempo de colonização (h); b (h⁻¹) e c (h^{-0,5}) = taxas fracionais constantes; t = tempo (h).

A taxa fracional média (h⁻¹) de produção de gases (μ) foi calculada como:

$$\mu = \frac{b + c}{2\sqrt{t}}$$

Em que, μ = taxa de produção de gases (h⁻¹); b (h⁻¹) e c (h^{-0,5}) = taxas fracionais constantes; t = tempo (h).

A degradabilidade efetiva foi obtida segundo metodologia de France et al. (1993):

$$DE = S_0 E^{-kT} (1 - KI) / (S_0 + U_0)$$

Em que, DE = Degradabilidade efetiva; k = taxa de passagem; sendo calculado para k= 0,2; 0,3; 0,4; 0,05; 0,06; 0,07 e 0,08; S₀ e U₀ = frações inicialmente fermentáveis e frações não fermentáveis, respectivamente, sendo:

$$I = \int_0^{\infty} \exp - [(b + k)(t - T) + c(\sqrt{t} - \sqrt{T})] dt.$$

As equações geradas foram comparadas por meio de teste de paralelismo e identidade de curvas de acordo com Regazzi e Silva (2004) ao nível de significância de 5%.

As variáveis foram submetidas à análise de variância, onde as médias dos tratamentos foram comparadas utilizando o teste Tukey ao nível de significância de 5%. Para as variáveis de degradação da matéria seca e matéria orgânica utilizou-se o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + \alpha_j + \epsilon_{ijk}$$

Em que, Y_{ijk} = parâmetro observado; μ = média geral; B_i = efeito do bloco i, i = 1,2,3. α_j = efeito dos aditivos nas dietas j, j = sem aditivos; virginiamicina, óleo funcional; óleo funcional + monensina; ϵ_{ijk} = erro aleatório.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão de fermentação ruminal da dieta sem aditivo foi diferente das dietas com os aditivos pelo teste de paralelismo (p<0,05), Tabela 3, enquanto as dietas com

a inclusão dos aditivos virginiamicina, óleo funcional, e óleo funcional + monensina, foram paralelas entre si. As dietas diferiram-se pelo teste de identidade ($p < 0,05$), em que somente os tratamentos virginiamicina e óleo funcional + monensina foram idênticas entre si. A dieta com óleo funcional diferiu dos demais aditivos e da dieta controle.

Tabela 3- Equações da produção cumulativa de gases expressas em mL/g de MS de dietas alto grão com diferentes aditivos

Tratamentos	Equações (Modelo de France)	R ²
Controle	$Y = 280,3 \times \{1 - \exp[-0,0701 \times (t - 0,0434) - (-0,1119) \times (\sqrt{t} - \sqrt{0,0434})]\}$	Aa 98,80
Virginiamicina	$Y = 199,5 \times \{1 - \exp[-0,093 \times (t - 1,3818) - (-0,0974) \times (\sqrt{t} - \sqrt{1,3818})]\}$	Bc 99,76
Óleo Funcional	$Y = 215,5 \times \{1 - \exp[-0,0951 \times (t - 0,7329) - (-0,1034) \times (\sqrt{t} - \sqrt{0,7329})]\}$	Bb 99,83
Óleo Funcional + Monensina	$Y = 195,9 \times \{1 - \exp[-0,1020 \times (t - 1,5963) - (-0,1234) \times (\sqrt{t} - \sqrt{1,5963})]\}$	Bc 99,72

Equações acompanhadas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna são paralelas pelo teste de paralelismo de curvas a 5% de probabilidade. Equações acompanhadas por letras minúsculas iguais na mesma coluna são idênticas pelo teste de identidade de curvas a 5% de probabilidade.

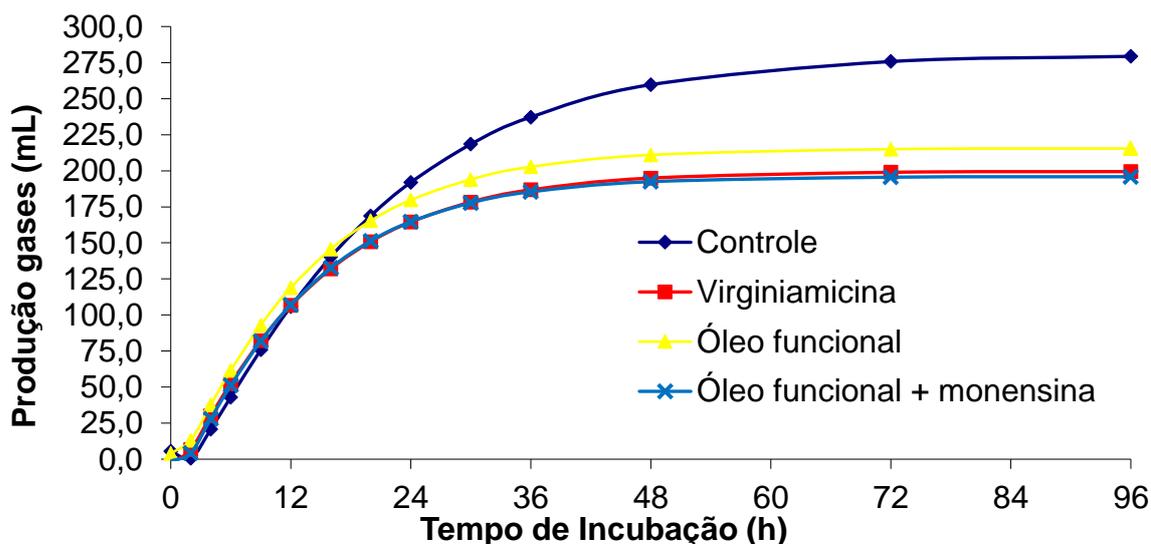


Figura 4- Curvas da produção cumulativa de gases em função do tempo de incubação.

Pode-se observar pela Figura 4 que às 24 horas de fermentação inicia-se o distanciamento entre as curvas de produção de gases em que a dieta controle, por não conter os aditivos, tem sua produção de gases elevada até as 96 horas. Enquanto as dietas com aditivo parecem atingir a máxima produção de gases às 36 horas, sem acréscimos significativos após este tempo.

Na tabela 4 se encontram-se os parâmetros da cinética de fermentação ruminal segundo France *et al.* (1993) e a degradabilidade efetiva referentes as taxas de passagens 5; 6; 7 e 8% h⁻¹. As dietas com aditivos virginiamicina e óleo funcional +

monensina apresentam menores produções totais de gases (A), sendo os valores 199,5 e 195,9 mL g⁻¹ MS⁻¹, respectivamente. A dieta com o aditivo óleo funcional produziu o total de gases de 215,5 mL g⁻¹ MS⁻¹, o que representa 10% de produção total de gases a mais que os outros tratamentos com aditivo. A produção total de gases do tratamento controle foi em média 37,7%, maior em relação às dietas com aditivo.

Tabela 4- Parâmetros da cinética de fermentação ruminal *in vitro* de dietas com diferentes aditivos utilizando o modelo de France e degradabilidade efetiva

Parâmetros de France	Tratamentos			
	Controle	Virginiamicina	Óleo Funcional	Óleo Funcional + Monensina
A*	280,30	199,50	215,50	195,90
TC* (hora: minutos)	00:20	01:22	00:43	01:35
μ*	0,05	0,08	0,08	0,08
DE** (5%)	88,28	81,87	84,74	80,92
DE** (6%)	87,38	79,98	83,32	78,90
DE** (7%)	86,48	78,12	81,92	76,90
DE** (8%)	85,58	76,30	80,53	74,95

A* = Total de gases (mL); TC = Tempo de colonização (horas); μ = Taxa de degradação fracional (h⁻¹); *Parâmetros estimados pelo modelo de France *et al.* (1993); **Degradabilidade efetiva.

As menores produções de gases nas dietas com aditivo, indicam o efeito que estes aditivos têm nas populações microbianas que, durante o seu processo metabólico têm como grande parte dos produtos gases como dióxido de carbono e metano. Indicam ainda que maior efeito sobre estas populações podem ser esperado quando se utiliza os aditivos antibióticos convencionais, embora a diferença na produção de gases totais tenha sido de 10% comparando o óleo essencial com o uso de virginiamicina e óleo funcional + monensina.

Zhou *et al.* (2020) estudando os níveis de inclusão 0; 13; 52; 91; 130 mL g⁻¹ MS⁻¹ de óleo de orégano e seus efeitos sob os parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*, produção de gás total, produção de metano e comunidades bacterianas, observaram efeito quadrático na produção total de gases, com valores 137,6; 124,4; 124,2; 125,0 e 128,9 mL g⁻¹ MS⁻¹ para os níveis, respectivamente.

O menor tempo de colonização (TC) foi verificado na dieta sem aditivos vinte minutos (00:20), seguido do óleo funcional, com o tempo médio de colonização de 43 minutos (00:43). No entanto, dietas com virginiamicina e óleo funcional + monensina, obtiveram os maiores tempos de colonização, sendo gasto o tempo de uma hora e

vinte e dois minutos (01:22) e uma hora e trinta e cinco minutos (01:35), respectivamente.

Segundo Guimarães et al. (2008) a variável tempo de colonização (TC), é o tempo no qual iniciou-se a incubação até o início da atividade microbiana sob a dieta testada. O menor tempo de colonização pode refletir em maior produção de gases. O uso de óleo funcional, como pode ser visto, permite mais rápida colonização e uso dos substratos pelos microrganismos.

A taxa de degradação fracional (μ) aumentou com a inclusão dos diferentes aditivos, havendo um aumento de 40,5% h^{-1} para dietas com virginiamicina, 42,4% h^{-1} para óleo funcional e 49,3% h^{-1} para óleo funcional + monensina em relação à dieta sem aditivos (controle), em média de 0,05 h^{-1} .

Os aumentos da taxa de degradação fracional para dietas com aditivos demonstraram que mesmo com as menores produções de gases em comparação com o controle (sem aditivo). Esse resultado é interessante para dietas com elevada taxa de passagem, como as dietas de confinamento com alta proporção de volumoso e mesmo sem volumoso, pois nestas dietas o bolo alimenta tende a deixar o rúmen mais rapidamente, uma vez que elas são rapidamente degradadas no rúmen, menor perdas podem ocorrer por redução no tempo de permanência neste compartimento, e por isso, possível redução na degradação.

Segundo Guimarães et al. (2008), a degradabilidade efetiva com taxa de passagem de 2% h^{-1} simulam animais em nível de manutenção, 5% h^{-1} simulam taxas de passagem de animais em nível médio de produção e 8% h^{-1} são taxas de passagem de animais com alto nível de produção. No presente estudo é interessante discorreremos somente sobre a taxa de passagem de 8% h^{-1} , pois dietas de alto grão, sem volumoso, para bovinos em confinamento, são rapidamente fermentáveis no rúmen, a ingesta tende a passar mais rápido ao abomaso e posteriormente para o intestino (GUIMARÃES et al., 2008).

A degradabilidade efetiva (DE), tabela 4, a uma taxa de passagem 8% h^{-1} , dieta sem aditivos apresenta valor superior às dietas com aditivos, com a média 85,58%. Com a inclusão dos aditivos observou-se redução na DE, cerca de 5,9% para dieta com óleo funcional, para dieta com virginiamicina houve redução de 10,84% e 12,42% para a dieta com inclusão de óleo funcional + monensina, todos comparados ao tratamento controle.

A DMS apresenta efeito significativo ($p < 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5). Maior degradação da matéria seca ocorreu na dieta controle em relação aos tratamentos virginiamicina e óleo funcional + monensina, porém, quando se utilizou apenas o óleo funcional a degradação da matéria seca não diferiu da dieta controle.

Embora a dieta controle tenha apresentado maior produção de gases, não houve impacto do uso de aditivos sobre a degradação da matéria orgânica das dietas com aditivos ($p > 0,05$). Indicando que os aditivos utilizados permitem semelhante uso da matéria orgânica, não prejudicando o uso da dieta em nível ruminal. A dieta com óleo funcional proporcionou, inclusive, semelhante degradação da MS que a dieta controle.

Tabela 5- Degradação da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO) em dietas de alto grão com diferentes aditivos

Variáveis	Tratamentos				Média	CV (%)	P
	Controle	Virginiamicina	Óleo Funcional	Óleo Funcional + Monensina			
DMS	91,5 a	90,0 b	90,6 ab	90,0 b	90,5	0,54	0,006
DMO	92,8	91,9	92,1	91,8	92,6	0,52	0,06

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferem entre si, pelo teste Tukey a 5%.

A combinação dos resultados de produção total de gases e DMS e MO, proporcionam resposta interessante, indicando que os aditivos modulam algumas populações de microrganismos ruminal sem prejuízo ao uso da MO da dieta, no entanto, reduz a produção de gases totais. Uma vez que grande parte dos gases produzidos durante o processo de degradação ruminal são dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4), esses gases representam cerca de 60% (CO_2) e 30 a 40% (CH_4) do total gases produzidos no rúmen (VALADARES; PINA, 2006, p. 173), acredita-se que os aditivos selecionam populações bacterianas mais eficientes no uso os substratos, perdendo menos energia na forma de metano (CH_4), e resultando em metabólitos mais eficientes como o propionato (CHAGAS, 2015; GUO et al., 2010; SU et al., 2021).

Zhou et al. (2020) estudando óleo de orégano observaram que a produção de propionato aumentou, com maior produção ($48,3 \text{ mmol L}^{-1}$) com a dose de 52 mg L^{-1} , o que ocasionou na redução na relação acetato: propionato reduziu, onde observou menor relação ($2,21 \text{ mmol L}^{-1}$) com a dose 130 mg L^{-1} , que também reduziu a produção de metano ($38,2 \text{ mL}$) nessa mesma dose.

Avaliando o líquido da castanha de caju (LCC) um dos componentes do produto Essential® testado no presente estudo, Su et al. (2021) observou diferença entre as comunidades de microrganismo com a suplementação de 4 g de LCC por 100 kg⁻¹ de peso vivo na dieta de vacas Holstein não lactantes, onde houve aumento significativo de bactérias envolvidas na síntese de propionato, sendo os gênero *Prevotella*, *Selenomonas*, *Succinivibrionaceae*, *Succiniclasticum* e de archea *Methanoplanus* e redução de *Butyrivibrio*, *Ruminococcaceae*, *Bacteroidales*, *Clostridiales* e archea *Methanobrevibacter*. Os autores sugerem que o aumento de archea *Methanoplanus* ocorreu devido a seletividade maior de substâncias fenólicas pela parede celular em relação à que a *Methanobrevibacter*.

Segundo Kozloski et al. (2019) há duas vias utilizadas para produção de propionato, a via do succinato que tem como substrato o succinato e a via do acrilato que utiliza o lactato como substrato, utilizado principalmente por bactérias *Megaphaera elsdenii* (LEEuw, et al., 2016; KOZLOSki et al., 2019) e *Selenomonas* spp. (FONSECA, 2012), em dietas de alto grão é necessário reduzir a ocorrência de acidose ruminal para evitar perdas de produtividade e econômicas. Godfrey et al. (1995) observou a redução do lactato com a suplementação com virginiamicina em dieta com adição abrupta de grãos de trigo, cevada ou aveia para ovinos, reduziu as concentrações de D-lactato e L- lactato em comparação a dietas sem o aditivo. Shen et al. (2017) observou que houve o aumento de bactérias produtoras de succinato com a dose 5 µM de monensina, possivelmente aumentando a produção de propionato pela via do succinato e redução de *Streptococcus bovis* (produtora de lactato).

No entanto, mais estudos investigando a produção totais de gases, produção de metano, concentrações de ácidos graxos voláteis (AGV's), lactato e análise das populações da microbiota ruminal com o uso do produto Essential® comparando-o ou em consorcio com ionóforos e não-ionóforos ou individualmente devem ser feitos.

Neste sentido, vantagens podem ser apontadas, como o melhor aproveitamento energético da dieta, mitigação da produção de gases de efeito estufa oriundos da produção de bovinos e impedir acidose ruminal e, posteriormente, distúrbios metabólicos com a redução das populações de microrganismo produtores de lactato.

6 CONCLUSÃO

O uso do aditivo óleo funcional em dieta de alto grão para bovinos terminados em confinamento reduz a produção cumulativa de gases *in vitro* em relação à dieta sem aditivo. A associação do aditivo óleo funcional com a monensina potencializa a redução da produção totais de gases, sendo semelhantes à dieta com o antibiótico não-ionóforo virginiamicina.

A degradação da matéria seca e orgânica *in vitro* da dieta com o aditivo óleo funcional é semelhante as dietas com os aditivos virginiamicina, óleo funcional associado ou não à monensina e sem aditivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC- Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. The main data showing the brazilian livestock profile. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/> Acesso em 30/11/2021. 2021.

ARAUJO, R. C. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro*. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**. 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL – AOAC. Official methods of analysis. Horwitz, W., ed. **AOAC International, Gaithersburg, MD; Washington, DC, USA**, 2005.

BARROS, L. V.; SILVA, A. G.; BENEDETI, P. D. B. Avaliação de dióxido de titânio em amostras fecais. **Métodos para Análise de Alimentos–INCT–Ciência Animal**. (Eds E Detmann, MA Souza, SC Valadares Filho, TT Berchielli, LS Cabral, MM Ladeira, MA Souza, AC Queiroz, EOS Saliba, DS Pina, JAG Azevedo), p. 205-214, 2012.

BENCHAR, C., CASALMGLIA, S., CHAVES, A. V., FRASER, G. R., COLOMBATTO, D., McALLISTER, T. A., & BEAUCHEMIN, K. A. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, 145(1-4), 209–228. 2008.

BICALHO, F.L.; BARBOSA, F.A.; GRAÇAS, D.S.; CABRAL FILHO, S.L.S.; LEÃO, J.M.; LOBO, C.F. Desempenho e análise econômica de novilhos Nelore submetidos a diferentes estratégias de suplementação alimentar nas fases de recria e engorda. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.4, p.1112-1120, 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

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

CANGEMI, J. M. Biodegradação de poliuretano derivado do óleo de mamona. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**. 2006.

COCITO, C. Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 145, 1979.

COE, M. L.; NAGARAJA, T. G., SUN, Y. D., WALLACE, N., TOWNE, E. G., KEMP, K. E., & HUTCHESON, J. P. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 8, p. 2259-2268, 1999.

COUTINHO FILHO, J. L. V.; PERES, R. M.; JUSTO, C. L. Produção de carne de bovinos contemporâneos, machos e fêmeas, terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 5, p. 2043-2049, 2006.

CHAGAS, L. J. Desempenho, metabolismo e emissão de metano de bovinos Nelore em terminação recebendo óleos funcionais em substituição ou combinação com monensina sódica na dieta. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**. 2015.

DÍAZ, T. G. Avaliação in vitro da inclusão do líquido da casca da castanha de caju em dietas para ruminantes. **Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá**, 2013.

FERRO, M. M.; DE MOURA, D. C.; GERON, L. J. V. Óleos essenciais em dietas para bovinos. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 14, n. 2, 2016.

GARCIA, F.; COLOMBATTO, D.; BRUNETTI, M.A.; MARTINEZ, M.J.; MORENO, M.V.; TURCATO, M.C.S.; LUCINI, E.; FROSSASCO, G.; FERRER, J.M. The reduction of methane production in the in vitro ruminal fermentation of different substrates is linked with the chemical composition of the essential oil. **Animals**, v.10, n.5, p.1-7, 2020.

GODFREY, S. I. et al. Virginiamycin to protect sheep fed wheat, barley or oats from grain poisoning under simulated drought feeding conditions. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 46, n. 2, p. 393-401, 1995.

GUIMARÃES, R. et al. Cinética de fermentação ruminal de silagens de milho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1174-1180, 2008.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, E. Emissões de metano do gado. **Journal of Animal Science**, no. 8: 2483-2492, 1995.

KOLLING, G. J. et al. Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 4221-4234, 2018.

KOZLOSKI, Gilberto Vilmar. **Bioquímica dos ruminantes**. Gilberto Vilmar Kozloski. – 3. ed. rev. e ampl. – Santa Maria: Editora UFSM, 216 p., 2019.

LANNA, D.P.D.; ALMEIDA, R. A terminação de bovinos em confinamento. **Visão Agrícola**, n.3, p.55-58, 2005.

LOPES, L.S.; LADEIRA, M.M.; NETO, O.R.M.; SILVEIRA, A.R.M.C.; REIS, R.P.; CAMPOS, F.R. Viabilidade econômica da terminação de novilhos nelore ereo norte em confinamento na região de Lavras-MG. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.4, p.774-780, 2011.

LEEJW, K.-J. et al. Effects of virginiamycin and monensin administered alone or together with Megasphaera elsdenii strain NCIMB 41125 on in vitro production of lactate and VFA and the effects of monensin and M. elsdenii strain NCIMB 41125 on health and performance of feedlot steers. **Livestock Science**, v. 183, p. 54-62, 2016.

MAPA. Instrução Normativa nº 44, de 15 de dezembro de 2015. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Brasília, DF, 2015.

MOREIRA, S. M. et al. Distinct Effects of Bovicin HC5 and Virginiamycin on in vitro Ruminant Fermentation and Microbial Community Composition. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 8, 2018.

NARVAEZ, N. et al. Effects of extracts of Humulus lupulus (hops) and Yucca schidigera applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 10, p. 2517-2522, 2013.

OGUNADE, I. et al. Monensin alters the functional and metabolomic profile of rumen microbiota in beef cattle. **Animals**, v. 8, n. 11, p. 211, 2018.

OLIVEIRA, O. A. M.; AMARAL A. G.; PEREIRA K. A.; CAMPOS J. C. D.; TAVEIRA R. Z. Utilização de aditivos modificadores da fermentação ruminal em bovinos de corte. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 1, p. 287-311, 2019.

OLIVEIRA, M. S. C.; MORAIS, S. M.; MAGALHÃES, D. V. Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **ActaTropica**, v.117, p.165–170, 2011.

PAULA, K. G. S. A. et al. Emissão de metano na pecuária: relação causa-efeito e mecanismos modulatórios. **PUBVET**, v. 13, p. 148, 2018.

PEREIRA, D.C.; GOES, R.H.T.B.; MARTINEZ, A.C.; GANDRA, J.R.; PRESENDO, E.; SANTOS, M.V.; OLIVEIRA, R.T.; SILVA, N.G.; RIBEIRO, M.G.; ALVEZ, J.L.R. In vitro evaluation of the association of chitosan and cashew nut shell liquid as additives for ruminants. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.20, p.01 - 12, 2019.

REGAZZI, A. J.; SILVA, C. H. O. Teste para verificar a igualdade de parâmetros e a identidade de modelos de regressão não-linear. **Revista de Matemática e Estatística**, v. 22, n. 2, p. 33-45, 2004.

RUSSELL, J. B.; BOTTJE, W. G.; COTTA, M. A. Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria: identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 242-252, 1981.

SANTOS, J. E. P. Distúrbios metabólicos. **Nutrição de Ruminantes**. (Eds TT Berchielli, AV Pires, SG de Oliveira), Jaboticabal, Funep, p. 439-516, 2006.

SANTOS, N. F. Uso de óleo funcionais em dietas de ovinos. **Mestrado (Dissertação)**, 2013.

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

SAFAEI, K. et al. Effects of high concentrate: forage ratio diets containing monensin on the management of ruminal acidosis in Gezhel lambs. **Small Ruminant Research**, v. 121, n. 2-3, p. 183-187, 2014.

SOUZA, K. A. Compostos naturais sobre o desempenho, comportamento, resposta imune e características de carcaça de bovinos terminados em confinamento. **Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá**, 2018.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOET, P. J.; FOX, D. G. AND RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating Cattle diets: II Carbohydrate 775 and protein availability. **Journal Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.

SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1518-1527, 1984.

SHEN, J. et al. Monensin and nisin affect rumen fermentation and microbiota differently in vitro. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1111, 2017.

VALADARES, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. **Nutrição de Ruminantes**. (Eds TT Berchielli, AV Pires, SG de Oliveira), Jaboticabal, Funep, p. 151-179, 2006.

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, p.3583-3597, 1991.

VÉLEZ-TERRANOVA, M.; CAMPOS GAONA, R.; SÁNCHEZ-GUERRERO, H. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir lametanogénesis ruminal. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.17, n.3, p. 489-499, 2014.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the

fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal feed science and technology**, v.48, n.3-4, p.185-197, 1994.

ZHOU, R. et al. Effects of oregano essential oil on in vitro ruminal fermentation, methane production, and ruminal microbial community. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 3, p. 2303-2314, 2020.