

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

Antunes Stella, L.[®]; Rosa Prates, É.; Zubieta, A.; Bayer, C. e Jardim Barcellos, J.O.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

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. Somente os tratamentos alho e canela reduziram 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. Os óleos essenciais testados no experimento na dosagem de 1 ml/l de solução são eficientes na redução do metano e da amônia.

Essential oils as ruminal fermentation modifiers to replace monensin sodium *in vitro*

SUMMARY

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 Only the garlic and cinnamon treatments reduced 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. 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.

PALAVRAS CHAVE ADICIONAIS

Amônia.
Extratos.
Metano.
Produção de gás.
Ruminantes.

ADDITIONAL KEYWORDS

Ammonia.
Extracts.
Gas production.
Methane.
Ruminants.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 02.06.2018
Aceptado/Accepted: 07.06.2019
On-line: 15.10.2019
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
laionstella@hotmail.com

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 & Blache, 2012). Alguns compostos

naturais, rotulados como seguros para humanos (FDA, 2004), são propostos como substitutos potenciais de antibióticos na alimentação de ruminantes (Salem et al., 2012; Khiaosa & Zebeli, 2013). Estes incluem metabólitos secundários de plantas como saponinas, taninos e 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 e cultivares 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 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, com as suas composições foram: controle (CON; substrato+meio de fermentação), monensina sódica (MON; Sigma Aldrich M5273), óleo de alho (ALH; 45% de dissulfeto dialílico e 35% de trissulfeto dialílico) óleo de canela (CAN; 85% de Cinamaldeído), óleo de cravo (CRA; 95% de eugenol), óleo de hortelã-pimenta (HOR; 48% de mentol), óleo de junípero (JUN; 48% de A-pipeno), óleo de laranja amarga (LAR; 92% de limoneno) e óleo de melaleuca (MEL; 37% de Terpinen 4-ol). 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. 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 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. A digestibilidade ver-

dadeira 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 ML sem aditivo, para análise das concentrações de metano. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido (Waters® Modelo e2695 e detector Waters 2414). O volume do gás metano produzido no tempo x foi calculado de acordo com Tavendale et al. (2005): Produção de CH₄ (ML/gMS) no tempo x = (CH₄%(x) - CH₄%(x-1))*40/100 + CH₄%(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 ML; PG = volume de gás produzido em ML. As concentrações dos ácidos graxos voláteis (ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico) 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®). 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). 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 materiais em alterar a cinética da fermentação ruminal pelos seus componentes (Tabela I). 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. Houve um efeito significativo dos tratamentos (Tabela II) no teor de N-NH₃ (P<0,001), juntamente com alterações na concentração de ácidos graxos voláteis e na proporção molar de acetato, propionato e butirato (P<0,001).

DISCUSSÃO

Para os OE serem aplicados na indústria animal eles devem melhorar a digestibilidade do alimento ou melhorar a conversão alimentar dos animais, sendo a redução da metanogênese uma questão favorável para a sustentabilidade. Os efeitos dos OE sobre a fermen-

tação 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 CH₄ (Bodas et al., 2012). Os tratamentos CAN e CRA mostraram potencial em reduzir a produção cumulativa de gás (PG), reduzindo em mais da metade 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 CH₄ (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.

Tabela I. Efeito do uso de óleos essenciais em 24h de fermentação *in vitro* (Effect of the use of essential oils in 24 h of fermentament in vitro)

Tratamentos	PG 24h	DMO 24h	FP	CH ₄ (MI)	CH ₄ % MO degradada	Contagem de protozoários x10 ⁵ /MI
CON	115,8 a	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.

Tabela II. Parâmetros fermentativos do uso de óleos essenciais em 24h de fermentação *in vitro* (Fermentative parameters of the use of essential oils in 24 hours of *in vitro* fermentation)

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

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. Mesmo utilizando um alto teor de concentrado na dieta, todos os tratamentos apresentaram um pH adequado. Os OE não são capazes de aumentar o pH ruminal, visando a estabilização frente a problemas metabólicos devido a dietas com alto teor de concentrado (Jahani-Azizabadi et al. 2014; Yadeghari et al. 2015). A concentração de N-NH₃ 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-NH₃ 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 C₂:C₃, torna o rúmen energeticamente mais eficiente e reduz a geração de CH₄. Ao se produzir propionato não há produção de H⁺ como observado para as rotas que levam à produção de acetato e butirato. Além disso, as vias metabólicas de produção de propionato servem de dreno de H⁺ (Van Soest, 1994).

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 que 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.

BIBLIOGRAFIA

- Association of official analytical chemists international - AOAC 1995, Official Methods of Analysis. 16 ed. Arlington, v. 2, 474 pp.
- Araujo, RC, Pires, AV, Mourão, GB, Abdalla, AL, & Sallam, SMA 2011, 'Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers', *Animal feed science and technology*, vol. 166, pp. 155-162.
- Benchaar, C, & Greathead, H 2011, 'Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 166, pp. 338-355.

- Bodas, R, Prieto, N, García-González, R, Andrés, S, Giráldez, FJ, & López, S 2012, 'Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 176, pp. 78-93.
- Calsamiglia, S 2007, 'Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation: a review', *Journal Dairy Science*, vol. 90, pp. 2580-2595.
- Cardozo, PW, Calsamiglia, S, Ferret, A, & Kamel, C 2005, 'Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle', *Journal of animal science*, vol. 83, pp. 2572-2579.
- Cieslak, A, Szumacher-Strabel, M, Stochmal, A, & Oleszek, W 2013, 'Plant components with specific activities against rumen methanogens', *Animal*, vol. 7, pp. 253-265.
- Cobellis, G, Trbalza-Marinucci, M, Marcotullio, MC, & Yu, Z 2016, 'Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation and rumen bacteria in vitro'. *Animal Feed Science and Technology*, pp. 215, 25-36.
- Dehority, BA 2003, 'Rumen Microbiology. Thrumpton, Nottingham, Nottingham University Press', 372 pp.
- Duffield, TF, Rabiee, AR, & Lean, IJ 2008, 'A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. Part 2. Production effects', *Journal of Dairy Science*, vol. 91, pp. 1347-1360.
- Durmic, Z & Blache, D 2012, 'Bioactive plants and plant products: effects on animal function, health and welfare. *Animal Feed Science and Technology*', vol. 176, pp. 150-162.
- Fandiño, I, Calsamiglia, S, Ferret, A, & Blanch, M 2008, Anise and capsicum as alternatives to monensin to modify rumen fermentation in beef heifers fed a high concentrate diet. *Animal feed science and technology*, 145(1-4), pp. 409-417.
- Food and Drug Administration of the US, Disponível em <http://www.fda.gov/>. Acesso em Setembro de 2015.
- Ferme, D, Banjac, M, Calsamiglia, S, Busquet, M, Kamel, C, & Avguštin, G 2004, 'The effects of plant extracts on microbial community structure in a rumen-simulating continuous-culture system as revealed by molecular profiling. *Folia microbiologica*', vol. 49, pp. 151-155.
- Frutos, P, Hervas, G, Giráldez, FJ, & Mantecón, AR 2004, 'Tannins and ruminant nutrition', *Spanish Journal of Agricultural Research*, vol. 2, pp. 191-202.
- Illius, AW & Jessop, NS 1996, 'Metabolic constraints on voluntary intake in ruminants', *Journal of Animal Science* vol. 74, pp. 3052-3062.
- Hristov, AN, Johnson, KA, & Kebreab, E 2014, Livestock methane emissions in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:E1320.
- Hundal, JS, Wadhwa, M, Bakshi, MPS 2016, 'Effect of supplementing essential oils on the in vitro methane production and digestibility of wheat straw', *Journal of Animal Nutrition*, vol 1, pp. 3-14
- Kamalak, A, Canbolat, O, Gurbuz, Y, Ozay, O, & Ozkose, E. 2005, 'Chemical composition and its relationship to in vitro gas production of several tannin containing trees and shrub leaves'. *Asian-Australian Journal Animal Science*, 18, pp. 203-208.
- Jahani-Azizabadi, H, Danesh Mesgaran, M, Vakili, A, & Rezayazdi, K 2014, 'Effect of some plant essential oils on in vitro ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet', *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 16, pp. 1543-1554.
- Joch, M, Cermak, L, Hakl, J, Hucko, B, Duskova, D, & Marounek, M 2016, 'In vitro screening of essential oil active compounds for manipulation of rumen fermentation and methane mitigation', *Asian-Australasian journal of animal sciences*, vol. 29, pp. 952-959.
- Jouany, JP & Morgavi, DP 2007, 'Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production', *Animal*, vol.1, pp. 1443-1466.
- Khiaosa-Ard, R & Zebeli, Q 2013, 'Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants', *Journal Animal Science*, vol. 91, pp. 1819-1830.
- Lin, B, Lu, Y, Salem, AZM, Wang, JH, Liang, Q, & Liu, JX 2013, 'Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included', *Animal feed science and technology*, vol. 184, pp. 24-32.
- Makkar, HPS 2004, 'Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources', *Animal Production and Health Series*, vol. 160. pp. 55-88.
- Mauricio, RM, Mould, FL, Dhanoa, MS, Owen, E, Channa, KS, & Theodorou, MK 1999, 'A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation'. *Animal Feed Science and Technology*, vol. 79, pp. 321-330.
- Mellor, S 2000. Nutraceuticals – alternatives to antibiotics, *World Poultry*, vol. 16, pp. 30-33.
- Menke, KH 1979, '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*, vol. 92, pp. 217-222.
- Nutrient requirements of small ruminants 2007, 'Sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press', 384 pp.
- Patra, AK & Saxena, J 2009, 'The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production', *Nutrition Research Reviews*, vol. 22 pp. 204-219.
- Patra, AK & Yu, Z 2012, 'Effects of essential oils on methane production, fermentation, abundance and diversity of rumen microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*' vol. 78, pp. 4271-4280.
- Patra AK, Yu Z 2013. '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*, vol. 148, pp. 352-360.
- Patra, AK 2017, 'Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances', *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol 8, n. 1, pp. 13-18.
- Pawar, MM, Kamra, DN, Agarwal, N, & Chaudhary, LC 2014, 'Effects of essential oils on in vitro methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor', *Agricultural Research*, vol. 3, pp. 67-74.
- Peripolli, V, Prates, ER, Barcellos, JOJ, McManus, CM, Wilbert, CA, Neto, JB, & Lopes, RB 2014, 'Models for gas production adjustment in ruminant diets containing crude glycerol', *Livestock Research for Rural Development*, pp. 26-28.
- Pinski, B, Günal, M, Abughazaleh, AA 2016, 'The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under in vitro conditions', *Animal Production Science*, vol. 56, no. 10, pp. 1707-1713.
- Rira, M, Chentli, A, Boufenera, S, & Bousseboua, H 2015, 'Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep in vitro', *Energy Procedia*, vol. 74, pp. 15-24.
- Rodrigues, PHM, K. C. Peixoto JR, & Sérgio CF 2007, '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*, vol. 36, pp. 1937-1944.
- Roy, D, Tomar, SK, Sirohi, SK, Kumar, V, & Kumar, M 2014, 'Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation in vitro using buffalo rumen liquor', *Veterinary World*, pp. 4-7.
- Schofield, P, Pitt, RE, Pell, AN 1994, 'Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production', *Journal Animal Science* vol. 72, pp. 2980-2991.
- Spanghero, M, Robinson, PH, Zanfi, C, & Fabbro, E 2009, 'Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows', *Animal feed science and technology*, vol. 2, pp. 153-157.
- Statistical Analysis System – SAS 2001, System for Microsoft Windows: release 8.2. Cary. 1 CD-ROM.
- Salem, AZM 2012. 'Oral administration of leaf extracts to rumen liquid donor lambs modifies in vitro gas production of other tree leaves', *Animal Feed Science and Technology*, vol. 176, pp. 94-101.
- Yadeghari, S, Malecky, M, Banadaky, MD, & Navidshad, B 2015, 'Evaluating in vitro dose-response effects of Lavandula officinalis essential oil on rumen fermentation characteristics, methane production and ruminal acidosis', *Veterinary Research Forum*, pp. 285.

- Tavendale, MH, Meagher, LP, Pacheco, D, Walker, N, Attwood, GT, & Sivakumaran, S 2005, '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*, vol. 123, pp. 403-419.
- Theodorou, MK, Williams, BA, Dhanoa, MS, McAllan, AB, & France, J 1994, 'A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds', *Animal feed science and technology*, vol. 48, pp. 185-197.
- Tedeschi, LO, Fox, DG, & Tylutki, TP 2003, 'Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets', *Journal Environmental Quality*, vol. 32, pp. 1591-1602.
- Van Soest, PJ 1994, *Nutritional ecology of the ruminant*, Cornell University Press. 476 pp.
- Wallace, RJ 2004, 'Antimicrobial properties of plant secondary metabolites'. *Proceedures of Nutritional Society*, vol. 63, pp. 621-629.