

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ÓLEO DA SEMENTE DE SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia virgilioides*
Kunth) COMO ADITIVO NUTRICIONAL PARA BOVINOS DE
CORTE**

Gabriella de Oliveira Dalla Martha

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ÓLEO DA SEMENTE DE SUCUPIRA-PRETA (*Bowdichia virgilioides*
Kunth) COMO ADITIVO NUTRICIONAL PARA BOVINOS DE
CORTE**

*Oil of Sucupira Seed (*Bowdichia virgilioides*) as Nutritional Additive for
beef cattle*

**Gabriella de Oliveira Dalla Martha
Zootecnista**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria
Co-orientador: Prof. Dr. Gumercindo Lorian Franco**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Área de Concentração: Produção Animal.

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2017**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Andnir Dalla Martha Filho e Valéria de Oliveira Dalla Martha pelo amor, carinho, apoio e, sobretudo, encorajando-me a cada segundo de minha vida a ser uma pessoa melhor e feliz.

Aos meus familiares que me incentivaram a nunca desistir e que durante minha jornada me proporcionaram um ambiente repleto de ensinamentos.

Aos professores Fábio José Carvalho Faria e Gumercindo Lorian Franco, meu orientador e co-orientador, que não mediram esforços em acompanhar o projeto, guiando-me e ensinando-me a arte da nutrição e produção de ruminantes.

Aos queridos amigos que me ajudaram a suportar e superar momentos de profundo desânimo e desavenças, transformando-os em repleta felicidade.

Aos amigos de mestrado e doutorado que sempre estiveram presente e me ajudaram nessa conquista, em especial, Anderson Luiz De Lucca Bento, Camila da Silva Pereira, Ibrahim Miranda Cortada Neto, Marcella Cândia D' Oliveira, Marcelo Vedovatto, Raizza Fátima Abadía Tulux Rocha, Marcus Vinicius Garcia Niwa e Eduardo Souza leal.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição de Ruminantes, em especial ao Sr. Antônio Straviz e à química MSc. Adriana Garabini que de forma paciente ajudaram-me nas análises laboratoriais e ao Ricardo Oliveira do setor de pós-graduação pela amizade e contribuição.

Aos estagiários dos cursos de Zootecnia e Medicina Veterinária da UFMS que participaram do experimento, pelo auxílio indispensável que deram durante a execução dos trabalhos do início ao fim, sempre prontos para atender e com vontade para aprender.

À Professora Alda Izabel de Souza e a toda sua simpática equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FAMEZ, pelos ensinamentos durante as análises e pelas considerações a respeito dos resultados obtidos.

Aos professores Dr. Luis Carlos Vinhas Ítavo e Dra. Marcella Cândia D' Oliveira pela valiosa contribuição, pela disponibilidade e prontidão em ajudar, sendo de fundamental importância para a qualidade desse trabalho; e pela participação dos membros da banca examinadora de defesa, professora Dra. Maria da Graça Moraes, Dra.

Andréa Roberto Duarte Lopes Souza, Dr. Cássio José da Silva e Dr. José Mauro da Silva Diogo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul que de forma objetiva e estruturada permitiu a realização deste curso de Doutorado.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela bolsa de estudo concedida durante o curso.

A Deus.

A todos que direta ou indiretamente me apoiaram e por ventura não foram aqui citados.

Resumo

DALLA MARTHA, G.O. Óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* kunth) como aditivo nutricional para bovinos de corte. 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Num ambiente de intensas pesquisas relacionadas à escolha de um substituto para a utilização de antibióticos e ionóforos na manipulação da fermentação ruminal, os óleos essenciais presentes nas plantas vêm se mostrando como uma alternativa promissora pela sua ação antimicrobiana. Os óleos essenciais são derivados do metabolismo secundário de vegetais e são responsáveis, por exemplo, pela proteção contra patógenos e insetos. Seu modo de ação e atividade antimicrobiana no ambiente ruminal ainda não estão bem estabelecidos, o que possibilita a abertura de novas frentes de pesquisas, tanto para substituição de ingredientes da dieta, como para modulação ruminal. Com isso, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth) sobre as concentrações séricas de enzimas e metabólitos, sobre a digestibilidade e produção de gases *in vitro*, sobre as variáveis ruminais (pH, N-NH₃ e ácidos graxos voláteis - AGV), sobre a degradabilidade da matéria seca (MS) e da fibra em detergente neutro (FDN), consumo voluntário e digestibilidade aparente dos nutrientes em dietas contendo suplementação concentrada para bovinos de corte. Utilizou-se quatro novilhos mestiços, com peso corporal médio inicial (PCi) de 450 ± 20 kg, recebendo feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai e 15 g kg⁻¹ PC de concentrado a base de milho, farelo de soja, ureia e mistura mineral. Os animais foram submetidos de forma aleatória aos seguintes tratamentos: Controle (0g de óleo da semente de sucupira-preta (OS)), 1,25g OS, 2,5g OS, e 3,75g OS, por kg de MS. O delineamento experimental adotado foi o quadrado latino (4x4). Não houve efeito do nível de inclusão de óleo sobre o pH, N-NH₃, variáveis séricas, sobre o consumo de nutrientes, na degradabilidade e digestibilidade da MS, matéria orgânica (MO) e FDN. Houve diferença significativa para horário sobre o pH e N-NH₃, e sobre a digestibilidade aparente da proteína bruta (PB) (768,0; 702,5; 676,1 e 699,9 g kg⁻¹ de MS) e na digestibilidade da PB *in vitro* (887,9; 921,8; 904,9 e 939,1 g kg⁻¹ de MS). Houve diferença na concentração relativa de ácido isobutírico (0,67; 0,81; 0,71; 0,80 mmol L⁻¹) e ácido isovalérico (0,91; 1,14; 1,21 e 1,11 mmol L⁻¹) sobre o total de ácidos graxos liberados no rúmen com a inclusão do óleo essencial de sucupira-preta. Houve diferença significativa para o *lag-time* (horas) nos parâmetros da fermentação ruminal *in vitro*. Assim, a partir dos dados apresentados, pode-se concluir que a inclusão do óleo da semente de sucupira-preta apresenta efeito temporário como modulador nutricional em dietas para bovinos de corte.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, aditivos naturais, fermentação ruminal, metabolismo, nutrição de ruminantes

Abstract

DALLA MARTHA, G.O. Oil of Sucupira Seed (*Bowdichia virgilioides*) a Nutritional Additive for beef cattle. Ano. 2017. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Due to intense research related to the choice of a substitute for the use of ionophore and antibiotics in the manipulation of ruminal fermentation, the essential oils present in plants have been shown to be a promising alternative for their antimicrobial action. Essential oils are derived from the secondary metabolism of plants and are responsible, for example, for protection against pathogens and insects. Its mode of action and antimicrobial activity in the ruminal environment are still not well established, which allows the opening of new research fronts, both for substitution of dietary ingredients and for ruminal modulation. Thereby, the objective of this study was to evaluate the effect of the inclusion of different levels of sucupira-black seed oil (*Bowdichia virgilioides* Kunth) on serum concentrations of enzymes and metabolites, on *in vitro* digestibility, *in vitro* gas production, on ruminal variables (pH, N-NH₃ and VFA), degradability, voluntary intake and digestibility of nutrient in diets for beef cattle. Four crossbred steers with initial mean body weight (BW) of 450 ± 20 kg were used, receiving grass hay *Panicum Maximum* cv. Massai and 15 g kg⁻¹ BW of concentrate based on corn, soybean meal, urea and mineral mix. The animals were randomly assigned to the following treatments: Control (0g of sucupira-black seed oil (OS)), 1,25g OS, 2,5g OS, and 3,75g OS, per kg of DMI. The experimental design was the Latin square (4x4). There was no effect of the inclusion level of essential oils on pH, N-NH₃, serum variables, on the degradability and digestibility of DM, OM and NDF. There was a significant difference *in vivo* digestibility of crude protein (CP) (768.0, 702.5, 676.1 and 699.9 g kg⁻¹ of DM) and *in vitro* digestibility of CP (887.9, 921.8, 904.9 and 939.1 g kg⁻¹ of DM). There was a difference in the relative concentration of isobutyric acid (0.67, 0.81, 0.71, 0.80 mmol L⁻¹) and isovaleric acid (0.91, 1.14, 1.21, 1.11 mmol L⁻¹) on the total fatty acids released in the rumen with the inclusion of sucupira-black essential oil. There was a significant difference for time on pH and N-NH₃. There was a significant difference for the *lag-time* (hours) in the ruminal fermentation parameters *in vitro*. Thus, from the data presented, it can be concluded that the inclusion of sucupira-black seed oil has a temporary effect as a nutritional modulator in diets for beef cattle.

Key words: metabolism, natural additives, ruminal fermentation, ruminant nutrition, volatile fatty acids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

- Figura 1- As diferentes vias metabólicas da planta envolvidas na síntese de metabolitos secundários (Adaptado de Jouany e Morgavi, 2007)..... 3
- Figura 2 – Principais monoterpênos (A), sesquiterpênos (B) e fenilpropanóides (C) dos óleos essenciais (Adaptado de Calsamiglia et al., 2007)..... 5
- Figura 3 – Visão esquemática dos sítios e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana (Adaptado de Benchaar et al., 2007)..... 7
- Figura 4– *Bowdichia virgilioides* Kunth: flor, folha, fruto e semente (Lorenzi, 2008)..... 11

Artigo - Óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) como aditivo nutricional para bovinos de corte: variáveis ruminais, degradabilidade, consumo voluntário e digestibilidade

- Figura 1 - Desaparecimento (fração 0-1) da matéria seca (MS) do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai no rúmen de bovinos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 43
- Figura 2 - Desaparecimento (fração 0-1) da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai no rúmen de bovinos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 44

LISTA DE TABELAS

Artigo - Óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) como aditivo nutricional para bovinos de corte: variáveis ruminais, degradabilidade, consumo voluntário e digestibilidade

- Tabela 1 - Composição químico-bromatológica do suplemento e do feno *Panicum maximum* cv. Massai. MS= matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo e MM = matéria mineral. Composição do suplemento concentrado (g kg⁻¹): milho grão (810 g), farelo de soja (160 g), ureia (15 g) e minerais (15 g). Níveis de garantia do suplemento concentrado (g ou mg kg⁻¹): Ca – máx: 18 g, mín - 12 g; P – máx: 5 g; Na – mín: 3,7 g; S – mín: 1,5 g; Zn – mín: 70,5 mg; F – máx: 50 mg; Cu – mín: 28 mg; Mn – mín: 12 mg; I – mín: 1,40 mg; Co – mín: 0,94 mg; Se – mín: 0,23 mg..... 40
- Tabela 2 - Ingestão (kg d⁻¹ e g kg⁻¹ de PC) de MS, PB, FDN e MO total e do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. MS: matéria seca, PB: proteína bruta, FDN: fibra em detergente neutro, MO: matéria orgânica. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS. PC: peso corporal, EPM: erro padrão da média. 41
- Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente da MS, MO, PB e FDNcp da dieta de novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, FDNcp: fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína. EPM: erro padrão da média. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS.¹ Y (linear) = 0,78 – 0,03 x tratamento (R² = 0,51; P = 0,0028); Y (quadrática) = 0,87 – 0,12 x tratamento + 0,02 x tratamento² (R² = 0,66; P = 0,0016)..... 42

Tabela 4 - Coeficiente de digestibilidade ruminal *in vitro* da MS, MO, PB e FDN do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai e do suplemento concentrado em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$). DIV: digestibilidade *in vitro*; MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, FDN: fibra em detergente neutro. EPM: erro padrão da média. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 42

Tabela 5 - Estimativa das variáveis ruminais de degradação da fibra em detergente neutro (FDN) e da matéria seca (MS) do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. a - fração solúvel; b - fração insolúvel potencialmente degradável; c - taxa de degradação (h^{-1}); DE - degradação efetiva ($0,02 \text{ h}^{-1}$); EPM: erro padrão da média. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 43

Tabela 6 – Parâmetros estimados da produção cumulativa de gases *in vitro* em líquido ruminal de bovinos, submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$). EPM = erro padrão da média; $^1\text{Lag} = 4,543 + 0,202 \times \text{tratamento}$ ($R^2 = 0,99$); A = produção cumulativa de gases das frações de rápida fermentação ($\text{mL}/100 \text{ mg}$ de MS incubada); B = taxa de fermentação da fração A ($\%/hora$); $\text{Lag} = \text{Lag-time} = \text{tempo de colonização microbiana}$ (horas); D = produção cumulativa de gases das frações de lenta fermentação ($\text{mL}/100 \text{ mg}$ de MS incubada); E = taxa de fermentação da fração D; Total = produção cumulativa de gases ($\text{mL}/100 \text{ mg}$ de MS incubada). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 44

Tabela 7 – Médias dos quadrados mínimos e erros padrões das médias do pH do líquido ruminal em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (Tukey, $P < .0001$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 45

Tabela 8–Médias dos quadrados mínimos e erros padrões das médias do N-NH_3 ruminal (mg dL^{-1}) em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (Tukey, $P < .0001$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 45

Tabela 9- Efeito da inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta de bovinos suplementados com concentrado na produção de ácidos graxos voláteis de cadeia curta no rúmen. C2 = ácido acético, C3 = ácido propiônico, iC4 = ácido isobutírico, nC4 = ácido n-butírico, iC5 = ácido isovalérico, nC5 = ácido n-valérico, nC6 = ácido n-capróico. EPM= erro padrão da média. Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (Tukey, $P < 0,05$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 46

Tabela 10– Parâmetros bioquímicos séricos em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. ALB: Albumina (g dL^{-1}), ALT: alanina aminotransferase (UI L^{-1}), AST: aspartato aminotransferase (UI L^{-1}), CR: creatinina (mg dL^{-1}), GGT: Gama glutamil transferase (UI L^{-1}), PT: proteínas totais (g dL^{-1}), UREIA: ureia (mg dL^{-1}). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA = aminoácidos	GGT = gama glutamil transferase
AGV = ácidos graxos voláteis	H ₂ SO ₄ = ácido sulfúrico
AGCC = ácidos graxos de cadeia curta	HPO ₃ = ácido metafosfórico
AGCR = ácidos graxos de cadeia ramificada	iC4 = ácido isobutírico
ALB = albumina	iC5 = ácido isovalérico
ALT = alanina amino transferase	IMS = ingestão de matéria seca
AST = aspartato amino transferase	MM = matéria mineral
C2 = ácido acético	MO = matéria orgânica
C3 = ácido propiônico	MS = matéria seca
C10 = monoterpenos	N = nitrogênio
C15 = sesquiterpenos	NAD ⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo
C20 = diterpenos	NADH = nicotinamida adenina dinucleotídeo
CH ₄ = gás metano	nC4 = ácido n-butírico
CK = creatinina kinase	nC5 = ácido n-valérico
CMS = consumo de matéria seca	nC6 = ácido n-capróico
DIVMO = digestibilidade in vitro da matéria orgânica	N-NH ₃ = nitrogênio amoniacal
DIVMS = digestibilidade in vitro da matéria seca	NNP = nitrogênio não proteico
DIVPB = digestibilidade in vitro da proteína bruta	OS = óleo essencial da semente de sucupira-preta
DIVFDN = digestibilidade in vitro da fibra em detergente neutro	PB = proteína bruta
EE = extrato etéreo	PT = proteína total
EPM = erro padrão da média	PCi = peso corporal inicial
FDA = fibra em detergente ácido	S = enxofre
FDN = fibra em detergente neutro	
FDNcp = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteínas	

SUMÁRIO

Revisão de Literatura

INTRODUÇÃO.....	1
1 Caracterização dos óleos essenciais.....	2
2 Modo de ação e atividade antimicrobiana.....	5
3 Os óleos essenciais e suas aplicações na nutrição de ruminantes.....	8
4 <i>Bowdichia virgilioides</i> e sua descrição.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

Artigo - Óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) como aditivo nutricional para bovinos de corte: variáveis ruminais, degradabilidade, consumo voluntário e digestibilidade

Resumo.....	17
Abstract.....	18
1. Introdução.....	19
2. Material e Métodos.....	20
3. Resultados.....	27
4. Discussão.....	29
5. Conclusões.....	36
Referências Bibliográficas.....	37
Tabelas e Figuras.....	40

INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção pecuária, a manipulação da fermentação ruminal se tornou uma valiosa ferramenta na busca pelo aumento da produtividade e eficiência alimentar. Além de minimizar o impacto ambiental da atividade agropecuária pela diminuição da quantidade de metano (CH₄) emitido ao ambiente (Nagaraja, 2003), busca-se o aumento na produção de propionato para melhorar o equilíbrio energético dos animais, reduzir a excreção de nitrogênio e reduzir a taxa de fermentação de carboidratos não fibrosos para diminuir o risco de acidose no rúmen e melhorar a digestão das fibras (Jouany e Morgavi, 2007).

As estratégias propostas para atingir esses objetivos são diversas e entre elas destaca-se a adaptação dos animais a dieta, o fornecimento de dietas completas, a alteração da frequência de alimentação, alteração na relação volumoso:concentrado, utilização de lipídios na dieta, como também o uso de antibióticos ionóforos e não-ionofóros (que são comumente utilizados na alimentação animal para prevenir doenças e distúrbios metabólicos) (Benchaar et al., 2008).

No entanto, com o uso rotineiro de antibióticos na nutrição de ruminantes, aumentou-se a preocupação com o surgimento de bactérias resistentes (o que representaria um risco a saúde humana), levando, conseqüentemente, a esforços consideráveis ao desenvolvimento de alternativas para a utilização desses antibióticos (Benchaar et al., 2008). A utilização de leveduras, saponinas, ácidos orgânicos e principalmente óleos essenciais têm ganhado destaque na produção agropecuária como seus possíveis substitutos (Jouany e Morgavi, 2007; Zeoula et al., 2011; Khiaosa-ard e Zebeli, 2014).

Os óleos essenciais são derivados dos metabólitos secundários presentes em diferentes partes da planta (casca, flores, frutos e sementes) e após serem extraídos podem apresentar ação antimicrobiana (Miguel, 2010). O crescimento de microrganismos é inibido por vários mecanismos, podendo estes ser em parte devido à natureza hidrofóbica de alguns componentes, tais como terpenos, flavonoides e compostos fenólicos (Calsamiglia et al., 2007). De modo geral, esses componentes podem interagir com a membrana celular e afetar a produção de energia das bactérias (Nicolson et al., 1999).

Já foram observados diversos efeitos sobre o metabolismo das proteínas, produção de ácidos graxos voláteis (AGV), digestão de fibras e produção de CH₄ (Calsamiglia et al., 2007; Yang et al., 2010; Khiaosa-ard e Zebeli, 2014), e por atuarem dessa forma variada, os óleos essenciais necessitam de conhecimento aprofundado para a adequada seleção e combinação dos princípios ativos, o que pode fornecer uma ferramenta útil para manipular a microbiota ruminal com maior eficiência.

Dessa forma, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth) sobre as concentrações séricas de enzimas e metabólitos, variáveis ruminais (pH, N-NH₃ e AGV), degradabilidade, digestibilidade *in vitro*, produção de gases *in vitro*, consumo voluntário e digestibilidade aparente dos nutrientes em bovinos de corte estabulados alimentados à base de volumoso de baixa qualidade e suplementação concentrada.

1. Caracterização dos óleos essenciais

Os vegetais, microrganismos e animais apresentam mecanismos metabólicos secundários capazes de produzir, transformar e acumular substâncias (flavonoides, saponinas, taninos e óleos essenciais) não relacionadas de forma direta ao crescimento, reprodução e à manutenção da vida do organismo produtor (Santos, 2004) (Figura 1). Esse conjunto metabólico lhes permite adequarem-se ao meio em que vivem e perpetuarem a sua espécie em determinado ecossistema, pois são responsáveis pela proteção contra patógenos, predadores e outros invasores, assim como estresse ambiental e doenças (Castro et al., 2004).

Os metabólitos secundários das plantas mais comumente avaliados são os óleos essenciais, que contrariamente ao seu nome, não são óleos verdadeiros. São chamados de óleos voláteis ou óleos etéreos, por apresentarem aparência oleosa à temperatura ambiente. São derivados dos componentes responsáveis pela fragrância, ou “quinta essência” de plantas e recebem esse nome devido ao seu aroma agradável (Miguel, 2010). Sua extração é realizada de diversas formas, sendo a destilação simples a mais utilizada, podendo também ser extraído por meio da fermentação ou por solventes (Zhang et al., 2010).

A composição do óleo essencial de uma planta é determinada geneticamente, porém, as condições ambientais no qual o vegetal se desenvolve, o ciclo vegetativo, o tipo de cultivo e o local de extração, influenciam na composição química dos óleos e

são capazes de causar variações significativas (Willians et al., 1998). São encontrados em todos os tecidos vivos de plantas, concentrados basicamente na casca, flores, folhas, nos rizomas e nas sementes (Miguel, 2010).

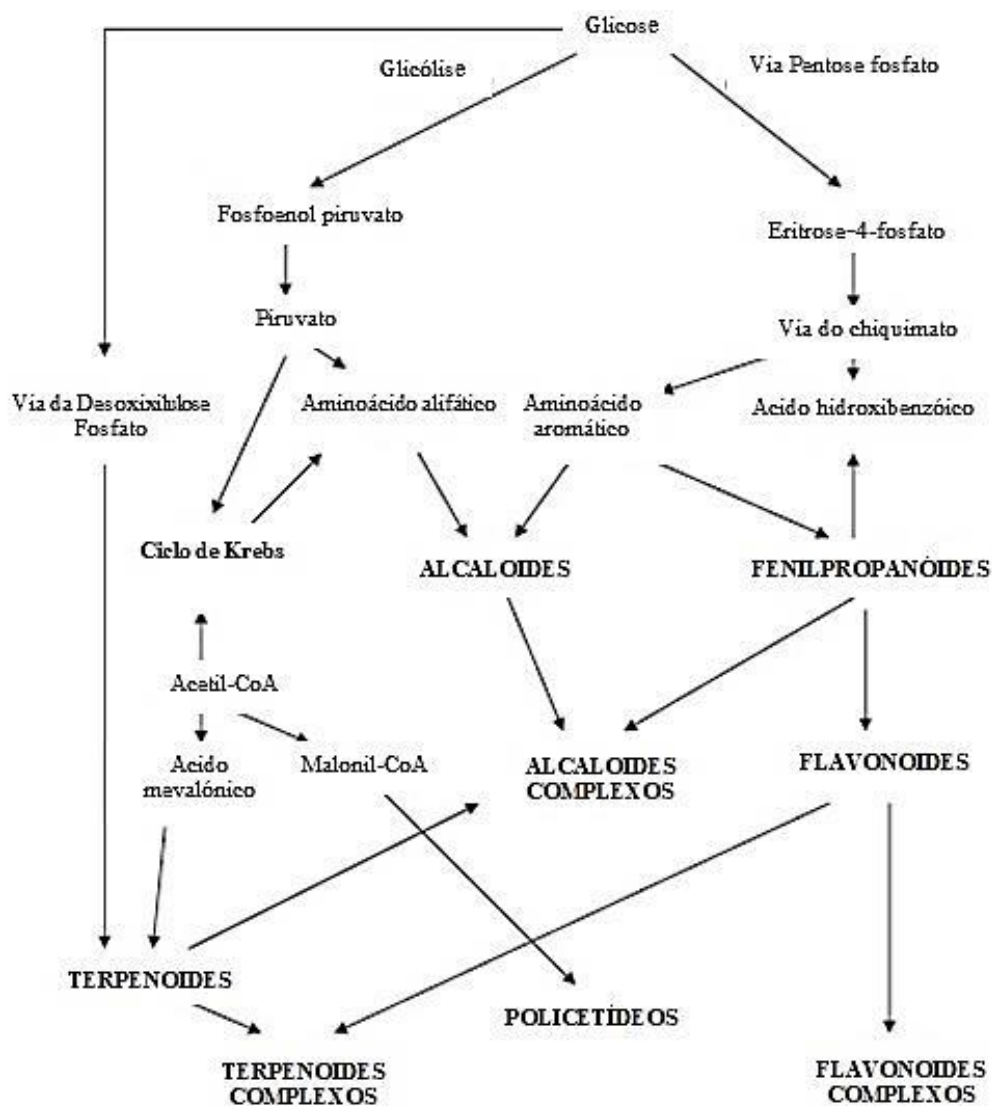


Figura 1-As diferentes vias metabólicas da planta envolvidas na síntese de metabolitos secundários (Adaptado de Jouany e Morgavi, 2007)

83 Quimicamente, os óleos essenciais são principalmente uma mistura complexa de
84 terpenoides e homólogos de fenilpropanoides, além de compostos fenólicos e
85 alcaloides, uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular,
86 ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres acíclicos, cumarinas e compostos contendo N e S
87 (Dorman e Deans, 2000).

88 Os terpenoides (derivados das vias do mevalonato e desoxixilulose - Figura 1)
89 constituem um grupo variado de substâncias que possuem como precursor básico uma
90 molécula de cinco carbonos (C_5H_8) denominada isopreno, e passam a ser classificados
91 de acordo com o número dessas moléculas em sua estrutura, tais como, monoterpenos
92 (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}) (Calsamiglia et al., 2007). Quando o
93 isopreno está associado a elementos adicionais (geralmente oxigênio), passam a ser
94 chamados de terpenoides ou isoprenoides (Benchaar et al., 2007).

95 Os monoterpenos são as moléculas mais representativas nos óleos essenciais e
96 chegam a constituir quase 90% do seu total. Seus principais princípios ativos são o
97 limoneno, timol, carvacrol, linalol, carvona, e acetato de geranilo (Figura 2).

98 Os fenilpropanoides são formados por um anel aromático de seis carbonos com
99 uma cadeia de três carbonos ligada a ele (C_6C_3), que são derivados dos esqueletos de
100 carbono dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina (Sangwan et al., 2001). São
101 sintetizados pela via do ácido chiquímico, funcional apenas em microrganismos e
102 plantas e seus principais princípios ativos são o cinamaldeído, eugenol, e anetolito
103 (Figura 2) (Jouany e Morgavi, 2007).

104

105

106

107

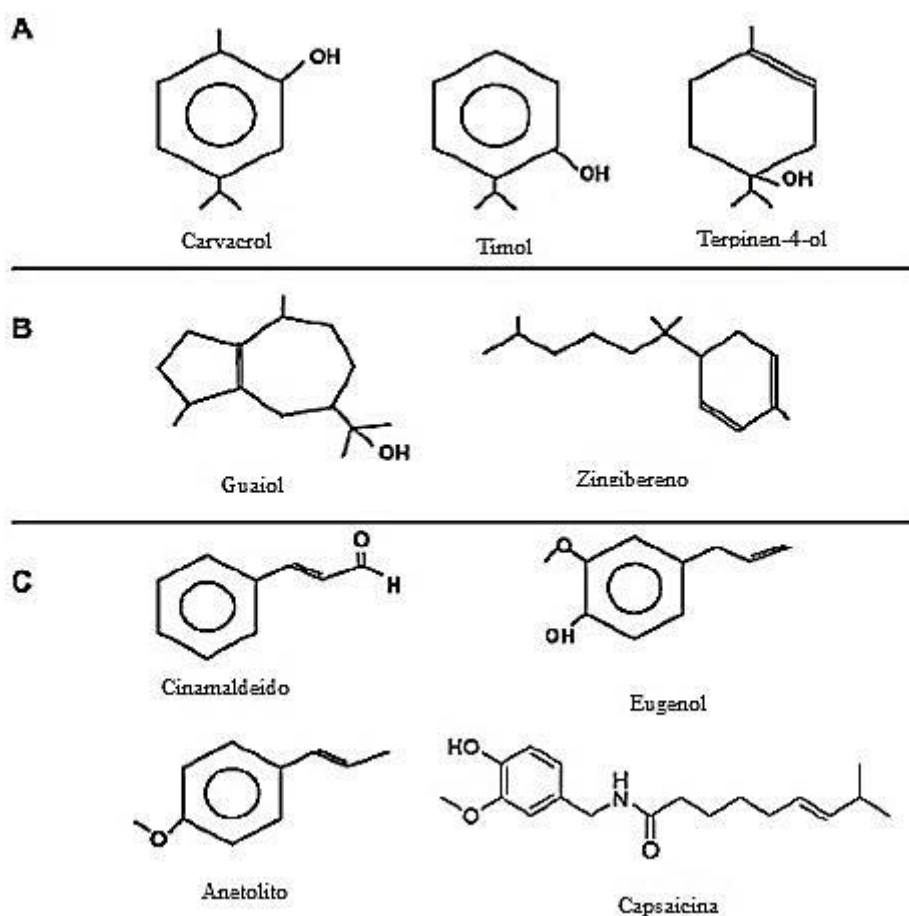


Figura 2 – Principais monoterpenos (A), sesquiterpenos (B) e fenilpropanoides (C) dos óleos essenciais (Adaptado de Calsamiglia et al., 2007)

2. Modo de ação e atividade antimicrobiana

A estrutura química de cada componente é o que determina o modo de ação e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Dorman e Deans, 2000). Dessa forma, uma série de teorias foram propostas para explicar o mecanismo pelo qual os óleos essenciais exercem sua atividade antibacteriana. Por se tratar de um grande número de componentes, é provável que a atividade antibacteriana não seja devido a um modo de ação específico, mas que envolvam vários alvos na célula bacteriana (Figura 3) (Burt, 2004).

Os óleos essenciais por atuarem na estrutura da parede celular bacteriana (desnaturando e coagulando proteínas) alteram a permeabilidade da membrana

125 citoplasmática para íons de hidrogênio e potássio (Benchaar et al., 2008). A alteração
126 dos gradientes de íons conduz à deterioração dos processos vitais da célula como
127 transporte de elétrons, translocação de proteínas, etapas da fosforilação e outras reações
128 dependentes de enzimas, o que resulta em perda do controle quimiosmótico da célula
129 afetada e morte bacteriana (Figura 3) (Dorman e Deans, 2000).

130 Alguns compostos presentes em óleos essenciais podem atuar não somente
131 contra bactérias Gram-positivas, mas também contra as Gram-negativas, como o caso
132 das classes dos terpenoides (Capsaicina, Timol, Mentol, Carvacrol, Cânfora, Eugenol) e
133 fenóis (Chao et al., 2000). Os óleos essenciais que demonstram tal efeito possuem
134 metabólitos secundários ativos de tamanhos reduzidos, o que permite sua passagem
135 através das porinas na membrana externa dessas bactérias, possibilitando o acesso à
136 membrana citoplasmática bacteriana, onde exercerão seus efeitos (Dorman e Deans,
137 2000).

138 As bactérias Gram-negativas apresentam dupla camada lipídica e na membrana
139 externa contém lipossacarídeos (o que a caracteriza como uma membrana hidrofílica),
140 acarretando em uma barreira à permeabilidade de substâncias hidrofóbicas, o que pode
141 explicar a resistência de bactérias Gram-negativas para efeito antimicrobiano de alguns
142 óleos essenciais (Chao et al., 2000).

143 Nos compostos fenólicos, como o timol e o carvacrol, a presença do grupo
144 hidroxila (-OH) (independente da posição), é fundamental para a existência dessa
145 atividade, já que esses dois compostos apresentaram atividades semelhantes frente a
146 variadas bactérias (Ultee et al., 2002). Sua capacidade de ação é determinada em função
147 do número de hidroxilas que atuam como agentes redutores contra o estresse oxidativo
148 (Ultee et al., 2002).

149 O carvacrol, por exemplo, na forma não dissociada se difunde através da
150 membrana citoplasmática para o citoplasma da bactéria, liberando seu próton. Em
151 seguida, o composto volta a ficar na forma não dissociada pela ligação a outro íon
152 potássio no citoplasma, sendo então, transportado através da membrana plasmática para
153 o ambiente externo. O íon potássio é trocado por um próton e o carvacrol na forma
154 protonada se difunde novamente através da membrana plasmática e se dissocia,
155 liberando o próton no citoplasma (Ultee et al., 2002).

156 No caso do cinamaldeído, devido à presença de um grupo carbonilo, pode
157 perturbar a membrana citoplasmática, ligar-se a proteínas, inativar enzimas microbianas
158 e esgotar o ATP celular (Burt, 2004).

Compostos como os flavonoides e terpenoides também apresentam atividade antioxidante. Essas substâncias podem interceptar e neutralizar radicais livres, impedindo a propagação do processo oxidativo (Hui, 1996). Segundo Benchaar et al. (2008) no ambiente ruminal, monoterpênos com função álcool e aldeído parecem ter maior efeito antimicrobiano, enquanto monoterpênos hidrocarbonetos causam pequena inibição e, em alguns casos, estímulo à atividade microbiana.

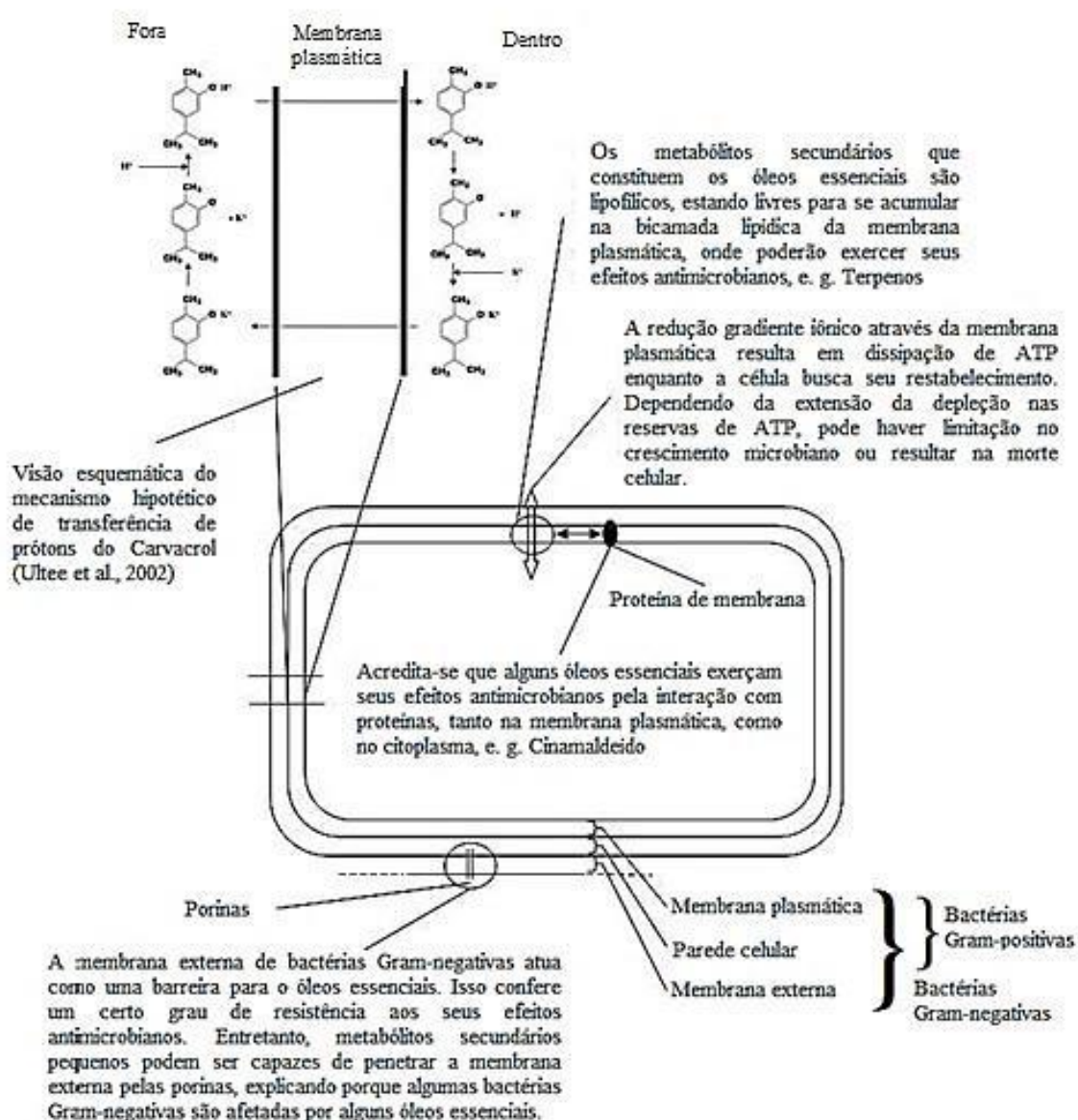


Figura 3 – Visão esquemática dos sítios e mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana (Adaptado de Benchaar et al., 2007)

3. Os óleos essenciais e suas aplicações na nutrição de ruminantes

A primeira visão do uso de óleos essenciais nas dietas para ruminantes foi como uma alternativa de se reutilizar subprodutos vegetais (Wohlt et al., 1981), contudo, recentemente, vários estudos *in vitro* e *in vivo* tem sido realizados para determinar os efeitos dos aditivos fitogênicos e seus componentes na fermentação da microbiota ruminal.

A utilização dos óleos essenciais para o consumo animal e humano foi permitida pela FDA (Food and Drug Administration), órgão governamental dos Estados Unidos responsável pelo controle dos alimentos, por se tratarem de substâncias reconhecidas como seguras, pois são produzidas naturalmente (FDA, 2006). No entanto, estes metabólitos secundários fazem parte do mecanismo de defesa utilizado pelas plantas contra patógenos, herbívoros e condições ambientais hostis. Assim, uma dosagem excessiva pode ser tóxica para animais ou pelo menos induz respostas negativas quando consumida (Jouany e Morgavi, 2007). Os mecanismos de toxicidade e doses tóxicas para animais não são bem conhecidos e poucas informações estão disponíveis sobre a transferência dessas substâncias para produtos comestíveis para animais, necessitando de estudos mais aprofundados (Jouany e Morgavi, 2007).

O uso dos aditivos naturais na nutrição de ruminantes fundamenta-se principalmente em propriedades antioxidante, antiinflamatória, imunoestimulante e antimicrobiana das saponinas, terpenoides, taninos e fenilpropanoides (Soliva et al., 2011). Suas atividades antimicrobianas trazem a possibilidade de se manipular a fermentação ruminal inibindo seletivamente grupos de microrganismos, o que melhora o aproveitamento dos nutrientes (Kamra et al., 2006).

Um exemplo disso é o gênero *Pterodon* que contém alcaloides na casca, isoflavonas e triterpenos no caule, e sesquiterpenos, diterpenos e isoflavonas nos óleos das sementes (Santos et al., 2010), e com isso demonstra atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*, mas não foi eficiente para inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (Dutra et al., 2009).

Atividades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes já foram descobertas em muitos óleos essenciais, como o caso do eugenol (presente no cravo-da-índia), o timol (presente no tomilho e no orégano), o carvacrol (presente no orégano), o limoneno (presente nos citros e na hortelã), e o guaiacol (presente na hortelã), cujas aplicações já

foram investigadas na nutrição animal, e foram revisados por Khiaosa-ard e Zebeli (2014) e Cobellis et al. (2016).

O carvacrol (no ambiente ruminal) é capaz de formar canais na membrana celular bacteriana dissolvendo a dupla camada fosfolipídica e alinhando-se entre os ácidos graxos, causando expansão e desestabilização, o que aumenta a fluidez e a permeabilidade passiva da membrana celular (Ultee et al., 2002).

Os efeitos de alguns óleos essenciais na microbiota e na fermentação ruminal são dependentes de diversos fatores, como sua estrutura química, o tipo de planta utilizada, o pH do fluido ruminal e da dosagem do composto utilizado, sendo sua utilização benéfica apenas em condições específicas (Calsamiglia et al., 2007; Cardozo et al., 2005). Com isso, uma gama desses compostos utilizados em diferentes níveis nas dietas tem demonstrado resultados variados.

De acordo com Calsamiglia et al. (2007) a ação dos óleos essenciais é favorecida nas condições ruminais em que o pH é mais baixo devido ao óleo encontrar-se sob forma hidrofóbica. Essa condição lhes confere a capacidade de interagir com os lipídios da membrana celular das bactérias, tornando dietas ricas em concentrado mais interessantes para a utilização de óleos essenciais.

Segundo Cardozo et al. (2005) ao utilizarem óleo de alho, cinamaldeído puro, pimenta vermelha e extrato de yucca em dietas ricas em forragens (pH neutro), os óleos essenciais mantiveram ou diminuíram o total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e ao mesmo tempo mantiveram ou aumentaram a relação acetato:propionato. Em contrapartida, quando o pH ruminal decresce para em torno de 5,5 a concentração total de AGCC aumenta e a relação acetato:propionato e a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) no rúmen diminuem.

Busquet et al. (2005) em experimento de produção de gás *in vitro*, ao compararem óleo de alho com monensina constataram que o óleo promoveu maior redução na produção de CH_4 (73,6%). Segundo os autores, a menor produção de CH_4 em relação à produção de AGV (CH_4 :AGV) leva à conclusão de que o óleo de alho possui capacidade de melhorar a eficiência da fermentação ruminal, aumentando a quantidade de energia obtida por unidade de substrato fermentado.

Em estudos realizados por Borchers (1965) e Broderick e Balthrop (1979) *in vitro*, a adição de timol no fluido ruminal (1 g L^{-1}), resultou no acúmulo de AA e diminuição na concentração de N-NH_3 , sugerindo a inibição da deaminação pelas bactérias ruminais. Da mesma maneira, Newbold et al. (2004) trabalhando com ovinos

238 fistulados, também observaram alterações na degradação da proteína e no processo de
239 deaminação no rúmen.

240 Resultados relacionados à diminuição da degradação *in situ* da proteína (Molero
241 et al., 2004) sugerem que outras ações além da menor deaminação devem ocorrer
242 quando óleos essenciais são utilizados. Castillejos et al. (2007) trabalhando com 5 mg
243 L⁻¹ de uma mistura de óleos essenciais sugeriram que os óleos essenciais podem possuir
244 ação inibitória da proteólise ou, talvez, estímulo à peptidólise, já que comprovaram que
245 a concentração de peptídeos de grande tamanho foi diminuída em 18%.

246 Outra situação observada com a utilização de diferentes óleos essenciais foram
247 os efeitos aditivos, antagonistas e sinérgicos entre os componentes (Burt, 2004).
248 Lambert et al. (2001) ao avaliarem a concentração mínima inibitória do óleo essencial
249 do orégano e seus dois componentes principais (timol e carvacrol) contra
250 *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, observaram que a combinação dos
251 dois compostos exibiu atividade antibacteriana mais elevada que qualquer um dos
252 compostos isoladamente, e que o efeito inibitório do óleo essencial de orégano, é,
253 principalmente, devido à ação aditiva antibacteriana destes dois compostos.

254

255 4. *Bowdichia virgilioides* e sua descrição

256 O gênero *Bowdichia* pertencente à família Fabaceae, é constituído por
257 aproximadamente 19 espécies e somente *Bowdichia nítida* e *Bowdichia virgilioides*
258 foram estudadas do ponto de vista químico e farmacológico. A espécie *Bowdichia nítida*
259 em recentes estudos fitoquímicos, revelou a presença de alcaloides, isoflavonoides,
260 xantonas e triterpenoides que apresentam importantes atividades biológicas (Matsuno et
261 al., 2008).

262 A *Bowdichia virgilioides* é uma espécie arbórea de casca grossa e fendilhada,
263 que pode atingir até 20 metros de altura. Possui folhas compostas, pinadas, com
264 folíolos pubescentes. A flor lilás confere um aspecto ornamental e floresce entre os
265 meses de outubro e dezembro. Os frutos são legumes com 3 a 5 cm de comprimento,
266 achatados, com pequenas sementes de coloração avermelhada (Figura 4) (Matsuno et
267 al., 2008).

268 Com ampla distribuição pelo Brasil, ocorrendo principalmente nas regiões
269 Norte, Nordeste e Centro-Oeste, é conhecida popularmente como sucupira-preta,

sucupira-do-cerrado e paricarana, bastante utilizada no paisagismo, na recuperação de áreas degradadas e em áreas de preservação permanente (Lorenzi, 2008).



Figura 4 – *Bowdichia virgilioides* Kunth: flor, folha, fruto e semente.
Fonte: Lorenzi (2008).

Sua casca e sementes são utilizadas na medicina popular na forma de infusão para o tratamento de artrite, bronquite, diabetes, diarreia, gota, hipertermia, condições inflamatórias do útero, reumatismo, e também como tônico corporal e facilitador da digestão (Pott e Pott, 1994).

Em investigações químicas recentes o isolamento de diversas substâncias que apresentam atividade antimicrobiana foram relatadas, como a antocianina, benzofuranoides, flavonoides (Arriaga et al., 2000), triterpenoides (Melo et al., 2001) e alcaloides (Barbosa-Filho et al., 2004).

287 Segundo Jorge-Neto (1970) o óleo dos frutos de *Bowdichia virgilioides*
288 contém farnesol, geraniol e cariofileno. E o óleo essencial das sementes, avaliado por
289 Feitosa et al. (2004) demonstraram atividade contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus vulgaris*,
290 *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e baixa atividade *in vitro* contra
291 *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*.

292 De acordo com Barros et al. (2010) ao testarem condições inflamatórias
293 agudas em ratos, observaram que o extrato de casca de *Bowdichia virgilioides* apresenta
294 atividade anti-inflamatória.

295 Souza (2015) testou a adição de 1% do óleo de sucupira-preta no concentrado
296 de borregas em crescimento e observou que não houve influencia no ganho de peso dos
297 animais, somente algumas alterações nos exames de sangue (bioquímico e hemograma)
298 que não foram relevantes ao ponto de que pudessem prejudicar a saúde dos animais.

299 Com isso, investigações científicas sobre os óleos essenciais da *Bowdichia*
300 *virgilioides* fazem parte de uma estratégia importante ligada à conservação da
301 biodiversidade, descoberta de novos medicamentos, sua possível ação antiinflamatória e
302 antibiotica e como modulador da fermentação ruminal.

303 Os resultados obtidos foram abordados no artigo intitulado “**Óleo da semente de**
304 **sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) como aditivo nutricional para bovinos de**
305 **corte: variáveis ruminais, degradabilidade, consumo voluntário e digestibilidade**”
306 cuja redação foi realizada de acordo com as normas editoriais da Revista Brasileira de
307 Zootecnia.

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

Referências Bibliográficas

- Arriaga, A. M. C.; Gomes, G. A.; Braz-Filho, R. 2000. Constituents of *Bowdichia virgilioides*. *Fitoterapia* 71:211-212.
- Barbosa-Filho, J. M.; Almeida, J. R. G. S.; Costa, V. C. O.; Da-Cunha, E. V. L.; Silva, M. S.; Braz-Filho, R. 2004. Bowdichine, a new diaza-adamantane alkaloid from *Bowdichia virgilioides*. *Journal of Asian Natural Products Research* 6:11-17.
- Barros, W. M.; Rao, V. S. N.; Silva, R. M.; Lima, J. C. S.; Martins, D. T. O. 2010. Anti-inflammatory effect of the ethanolic extract from *Bowdichia virgilioides* H.B.K stem bark. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 82:609-616.
- Benchaar, C.; Petit, H. V.; Berthiaume, R.; Ouellet, D. R.; Chiquette, J.; Chouinard, P. Y. 2007. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science* 90:886-897.
- Benchaar, C., McAllister, T. A.; Chouinard, P. Y. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *Journal of Dairy Science* 91:4765-4777.
- Borchers, R. Proteolytic activity of rumen fluid *in vitro*. 1965. *Journal of Animal Science* 24:1033-1038.
- Broderick, G. A.; Balthrop J. E., 1979. Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *Journal of Animal Science* 49:1101-1111.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel C. 2005. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology* 124:597-613.
- Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P. W.; Castillejos, J.; Ferret, A. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science* 90:2580-2595.
- Cardozo, P. W.; 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*. 83:2572-2579.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 132:186-201.

- 369 Castro, H. G.; Ferreira, F. A.; Silva, D. J. H.; Mosquim, P. R. 2004. Metabólitos
370 secundários – contribuição ao estudo das plantas medicinais. 2. ed. Visconde do Rio
371 Branco.
- 372
- 373 Chao, S. C.; Young, G. D.; Oberg, C. J. 2000. Screening for inhibitory activity of
374 essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. Journal of essential oil research
375 12: 639-649.
- 376
- 377 Cobellis, G.; Trabalza-Marinucci, M.; Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils
378 as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Science of the Total
379 Environment 545–546:556–568.
- 380
- 381 Dorman, D. H.; Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial
382 activity of plant volatile oils. Journal Applied Microbiology 88: 308–316.
- 383
- 384 Dutra, R. C.; Fava, M.B.; Alves, C.C.; Ferreira, A.P.; Barbosa, N. R. 2009.
385 Antiulcerogenic and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Pterodon*
386 *emarginatus* seeds. Journal Pharmacy and Pharmacol 61:243-250.
- 387
- 388 FDA. Food and Drug Administration. 2006. Risk Assessment of Streptogramin
389 Resistance in *Enterococcus faecium* Attributable to the Use of Streptogramins in
390 Animals. Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine.
- 391
- 392 Feitosa, J. G. R.; Silva, E. S.; Rodrigues, M.O.; Alves, P. B. 2004. Atividade
393 antimicrobiana do óleo essencial de *Bowdichia virgilioides* pelo método de difusão
394 em placa. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Salvador,
395 Brasil.
- 396
- 397 Hui, Y. H. 1996. Oleoresins and essential oils. Bailey's industrial oil and fat products.
398 New York:Wiley-Interscience Publication 6:145-153.
- 399
- 400 Jorge-Neto, J. 1970. Pharmacognostic study of essential oil of sucupira, *Bowdichia*
401 *virgilioides*. Revista da faculdade de farmácia e odontologia de Araraquara 4:203-
402 204.
- 403
- 404 Jouany, J. P.; Morgavi, D. P. 2007. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic
405 feed additives in ruminant production. Animal 1:1443–1466.
- 406
- 407 Kamra, D. N.; Agarwal, N.; Chaudhary, L. C. 2006. Inhibition of ruminal
408 methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. International
409 Congress Series 1293:156-163.
- 410
- 411 Khiaosa-ard, R.; Zebeli, Q. 2014. Meta-analysis of the effects of essential oils and their
412 bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in
413 ruminants. Journal of Animal Science 91:1819–1830.
- 414
- 415 Lambert, R. J. W.; Skandamis, P. N.; Coote, P. and Nychas, G. J. E. 2001. A study of
416 the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil,
417 thymol and carvacrol. Journal of Applied Microbiology 91:453-462.
- 418

- 419 Lorenzi, H. 2008. Árvores brasileiras. 3 ed. São Paulo: Plantarum.
420
- 421 Matsuno, Y.; Deguchi, J.; Hirasawa, Y.; Ohyama, K.; Toyoda, H.; Hirobe, C.; Ekasari,
422 W.; Widyawaruyanti, A.; Zaini, N. C.; Morita, H. 2008. Sucutiniranes A and B, new
423 cassane-type diterpenes from *Bowdichia nitida*. Bioorganic and Medicinal
424 Chemistry Letters 18:3774-3777.
425
- 426 Melo, F. N.; Navarro, V. R.; Silva, M. S.; Da-Cunha, E. V.; Barbosa-Filho, J. M.; Braz-
427 Filho, R. 2001. Bow-denol, a new 2,3-dihydrobenzofuran constituent from
428 *Bowdichia virgilioides*. Natural Product Letters 15:261–266.
429
- 430 Miguel, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review.
431 Flavour and Fragrance Journal 25:291-312.
432
- 433 Molero, R.; Ibars, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Losa, R. 2004. Effects of a specific
434 blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in
435 heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. Animal Feed Science
436 and Technology 114:91-104.
437
- 438 Nagaraja, T. G. 2003. Response of the Gut and Microbial Populations to Feedstuffs:
439 The ruminant story. In Proc. 64th Minnesota Nutrition Conference. St. Paul, MN.
440
- 441 Nicolson, K.; Evans, G.; O'Toole, P. W. 1999. Potentiation of methicillin activity
442 against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. FEMS Microbiol
443 Letter 179:233-239.
444
- 445 Newbold, C.; McIntosh, J.; Williams, F.; M.; Losa, P.; Wallace, R. J. 2004. Effects of a
446 specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed
447 Science and Technology 114:105-112.
448
- 449 Pott, A.; Pott, V. J. 1994. Plantas que curam. Embrapa, 161.
450
- 451 Sangwan, N. S.; Farooqi, A. H. A.; Shabih, F.; Sangwan, R. S. 2001. Regulation of
452 essential oil production in plants. Plant Growth Regulation 34:3-21.
- 453 Santos, R. I. 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In:
454 Simoes, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.;
455 Petrovick, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. Ed. Porto Alegre,
456 RS: Ed. da UFSC.
457
- 458 Santos, A. P.; Zatta, D.T.; Moraes, W.F.; Bara, M. T. F.; Ferri, P. H.; Silva, M. R. R.;
459 Paula, J. R. 2010. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial
460 e ocorrência de esteróides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae.
461 Revista Brasileira de Farmacognosia 20:891-896.
462
- 463 Soliva, C. R.; Amelchanka, S. L.; Duval, S. M.; Kreuzer, M. 2011. Ruminant methane
464 inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as
465 determined with a rumen simulation technique (Rusitec). British Journal of
466 Nutrition 106:114–122.
467

- 468 Souza, D. C. 2015, Avaliacao da inclusão do óleo de sucupira na suplementação de
469 borregas mestiças (*Bowdichia virgilioides* kunth.). Brasília: Faculdade de
470 Agronomia e Medicina Veterinaria, Universidade de Brasília, p. 34 Monografia.
471
- 472 Ultee, A.; Bennik, M. H. J.; Moezelaar, R. 2002. The phenolic hydroxyl group of
473 carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*.
474 *Applied and Environmental Microbiology* 68:1561–1568.
475
- 476 Willians, L. R.; Stockley, W. 1998. Essential oils with high antimicrobial activity for
477 therapeutic use. *The international journal of aromatherapy* 8:4.
478
- 479 Wohlt, J. E.; Fiallo, J. F.; Miller, M. E. 1981. Composition of by-products of the
480 essential-oil industry and their potential as feeds for ruminants. *Animal Feed*
481 *Science and Technology* 6:115-121.
482
- 483 Zeoula, L. M.; Beleze, J. R. F.; Maeda, E. M.; Simioni, F. L.; Geron, L. J. V.; Rigolon,
484 L. P. 2011. Levedura ou monensina na dieta de bovinos e bubalinos sobre a
485 fermentação ruminal e eficiência microbiana. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*
486 33: 379-386.
487
- 488 Zhang, W.; Xiao, S.; Samaraweera, H.; Lee, E. J.; Ahn, D. U. 2010. Improving
489 functional value of meat products. *Meat Science* 86:15-31.
490
- 491 Yang, W. Z.; Benchaar, C.; Ametaj, B. N.; Beuchemin, K. A. 2010. Dose response to
492 eugenol supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and
493 intestinal digestion. *Animal Feed Science and technology* 158:57-64.
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510

Óleo da Semente de Sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*) como Aditivo Nutricional para Bovinos de Corte: Variáveis Ruminais, Degradabilidade, Consumo Voluntário e Digestibilidade

Gabriella de Oliveira Dalla Martha¹, Gumercindo Lorian Franco¹ e Fábio José Carvalho Faria¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil, 79070-900 E-mail: fabio.faria@ufms.br; gumercindo.franco@ufms.br

RESUMO: Objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth) sobre as concentrações séricas de enzimas e metabólitos, sobre as variáveis ruminais (pH, N-NH₃ e AGV), degradabilidade da MS e FDN, consumo voluntário, produção de gases *in vitro* e digestibilidade aparente e *in vitro* dos nutrientes em dietas para bovinos de corte. Utilizou-se quatro novilhos mestiços, com peso corporal médio inicial (PCi) de 450 ± 20 kg, recebendo feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai e 15g de suplemento concentrado por kg⁻¹ PC. Os animais foram distribuídos de forma aleatória nos seguintes tratamentos: Controle (0g de óleo essencial da semente de sucupira-preta (OS)), 1,25g OS, 2,5g OS, e 3,75g OS, por kg de MS. O delineamento experimental adotado foi o quadrado latino (4x4). Não houve efeito do nível de inclusão de óleo sobre o pH, N-NH₃, variáveis séricas, sobre o consumo voluntário dos nutrientes, na degradabilidade e digestibilidade da MS, MO e FDN. Houve diferença significativa para horário sobre o pH e N-NH₃, e sobre a digestibilidade aparente da proteína bruta (PB) (768,0; 702,5; 676,1 e 699,9 g kg⁻¹ de MS) e na digestibilidade da PB *in vitro* (887,9; 921,8; 904,9 e 939,1 g kg⁻¹ de MS). Houve diferença na concentração relativa de ácido isobutírico (0,67; 0,81; 0,71; 0,80 mmol L⁻¹) e ácido isovalérico (0,91; 1,14; 1,21 e 1,11 mmol L⁻¹) sobre o total de ácidos graxos liberados no rúmen com a inclusão do óleo essencial de sucupira-preta. Houve diferença significativa para o *lag-time* (horas) nos parâmetros da fermentação ruminal *in vitro*. Assim, a partir dos dados apresentados, pode-se concluir que a inclusão do óleo da semente de sucupira-preta apresenta efeito temporário como modulador nutricional em dietas para bovinos de corte.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, aditivos naturais, fermentação ruminal, metabolismo

Black-Sucupira Seed Oil (*Bowdichia virgilioides*) as a Nutritional additive for Beef Cattle: Ruminal Variables, Degradability, Voluntary Consumption and Digestibility

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the effect of inclusion of different sucupira-black seed oil (*Bowdichia virgilioides* Kunth) on serum concentrations of enzymes and metabolites on ruminal variables (pH, N-NH₃ and VFA), DM And NDF, voluntary consumption, *in vitro* gas production and apparent and *in vitro* digestibility of nutrients in diets for beef cattle. Four crossbred steers with initial mean body weight (BW) of 450 ± 20 kg were used, receiving grass hay *Panicum Maximum* cv. Massai and 15g of concentrated supplement per kg⁻¹ BW. The animals were randomly assigned to the following treatments: T1 - Control (0g of oil (OS)), T2 - 1,25g OS, T3 - 2,5g OS, and T4 - 3,75g OS, per kg of DM Consumed. The experimental design was the Latin square (4x4). There was no effect of the inclusion level of essential oils on pH, N-NH₃, serum variables, on the degradability and digestibility of DM, OM and NDF. There was a significant difference *in vivo* digestibility of crude protein (CP) (768.0, 702.5, 676.1 and 699.9 g kg⁻¹ of DM) and *in vitro* digestibility of CP (887.9, 921.8, 904.9 and 939.1 g kg⁻¹ of DM). There was a difference in the relative concentration of isobutyric acid (0.67, 0.81, 0.71, 0.80 mmol L⁻¹) and isovaleric acid (0.91, 1.14, 1.21, 1.11 mmol L⁻¹) on the total fatty acids released in the rumen with the inclusion of sucupira-black essential oil. There was a significant difference for time on pH and N-NH₃. There was a significant difference for the *lag-time* (hours) in the ruminal fermentation parameters *in vitro*. Thus, from the data presented, it can be concluded that the inclusion of sucupira-black seed oil has a temporary effect as a nutritional modulator in diets for beef cattle.

Key words: metabolism, natural additives, ruminal fermentation, volatile fatty acids

Introdução

As plantas produzem uma ampla variedade de compostos orgânicos derivados do seu metabolismo secundário que são classificados principalmente em saponinas, taninos e óleos essenciais (Calsamiglia et al., 2007). Alguns desses óleos possuem atividades antimicrobianas e atualmente são considerados seguros para consumo humano e animal (FDA, 2006).

Em dietas para ruminantes, a primeira visão da utilização dos óleos essenciais foi como uma alternativa de se reutilizar subprodutos vegetais (Wohlt et al., 1981). Contudo, recentes estudos procuram entender a atuação desses óleos sobre o ambiente ruminal, se possuem efeito semelhante ao dos ionóforos sobre a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV), diminuição da emissão de CH₄ e maior aproveitamento dos nutrientes (Benchaar et al., 2007; Tager e Krause, 2011; Lin et al., 2013).

Segundo Dorman e Deans (2000) e Burt (2004), não há um mecanismo de ação específico para os componentes dos óleos essenciais no ambiente ruminal, pois existem vários alvos na célula bacteriana que podem causar alterações da membrana citoplasmática, na força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo e na desnaturação e coagulação do conteúdo da célula atingida, e que esses mecanismos ainda precisam ser mais estudados.

A sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides*), árvore pertencente à família Fabaceae é encontrada com maior frequência nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil e o óleo da semente pode ser uma alternativa promissora em substituição de ingredientes utilizados para alimentação humana, assim como possível modulador da fermentação ruminal.

Extratos da casca e da semente já são utilizados na medicina popular para tratar algumas condições inflamatórias e segundo Feitosa et al. (2004), a ação antimicrobiana

do óleo essencial das sementes de sucupira-preta foi avaliada e apresentou maior atividade contra as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis*, *Bacillus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de diferentes níveis de óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth) sobre as concentrações séricas de enzimas e metabólitos, sobre as variáveis ruminais (pH, N-NH₃ e AGV), na degradabilidade da MS e FDN, consumo voluntário, produção de gases *in vitro* e digestibilidade aparente e *in vitro* dos nutrientes em bovinos de corte estabulados alimentados à base de volumoso de baixa qualidade e suplementação concentrada.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Metabolismo Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), localizado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil (20° 26' 34" S; 54° 38' 47" W). Foi realizado de abril a julho de 2016, e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o protocolo nº 639/2014.

Foram utilizados quatro novilhos mestiços (½ Holandês + ½ Zebu) com peso corporal médio inicial (PCi) de 450 ± 20 kg, canulados no rúmen, alojados em galpão coberto, com piso de concreto e baias individuais providas de comedouros e bebedouros.

O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino (4x4), com quatro tratamentos, quatro animais e quatro períodos. Cada período experimental consistiu de 14 dias de adaptação aos tratamentos e 7 dias de colheita de dados.

627 Os animais foram alimentados com dieta à base de feno de capim *Panicum*
628 *maximum* cv. Massai, de baixa qualidade e suplemento concentrado contendo a
629 participação de milho (810,0 g kg⁻¹), farelo de soja (160,0 g kg⁻¹), ureia (15 g kg⁻¹) e
630 mistura mineral (15 g kg⁻¹). A composição químico-bromatológica do suplemento
631 experimental e do feno de *Panicum maximum* cv. Massai é mostrada na Tabela 1.

632 Os tratamentos experimentais consistiram na inclusão de diferentes níveis de
633 óleo da semente de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth) (OS) por kg de MS,
634 sendo: Controle (0g de OS), 1,25g OS, 2,5g OS, e 3,75g OS.

635 O óleo utilizado foi adquirido pela empresa Mundo dos Óleos, sendo obtido
636 mediante a extração a frio da semente. Foi fornecido via cânula ruminal às 7:00 horas
637 misturado a 1 kg de concentrado para que seu consumo fosse assegurado. O volumoso
638 foi oferecido em duas refeições diárias às 7:00 e 16:00 horas. A quantidade de
639 volumoso oferecido foi ajustada diariamente de modo a manter uma sobra de
640 aproximadamente 150 g kg⁻¹ do total fornecido, garantindo consumo *ad libitum*. O
641 suplemento foi oferecido diariamente às 7:00 horas na quantidade de 15 g kg⁻¹ de PC.

642 Para determinação do pH e N-NH₃ foram coletadas amostras de líquido ruminal
643 no final de cada período experimental à zero hora (antecedendo à suplementação), 2, 4,
644 6, 8, 10 e 12 horas após o fornecimento do óleo. O líquido ruminal foi coletado (via
645 cânula) de forma manual em diferentes locais do rúmen e filtrado em tecido de algodão.
646 Imediatamente após a colheita foi realizada a aferição do pH com o uso de um
647 potenciômetro digital (Quimis®, modelo: Q400AS).

648 Uma alíquota de 50 mL de líquido ruminal foi armazenada congelada em tubos
649 plásticos após acidificação com 5 gotas de H₂SO₄ (50%) para posterior determinação do
650 N-NH₃. O líquido ruminal foi descongelado e analisou-se o sobrenadante para teor de
651 NNP por uma adaptação ao método de Fenner (1965).

652 Uma alíquota de 5 mL de líquido ruminal foi armazenada congelada em tubos
653 plásticos após acidificação com 5 gotas de HPO_3 para posterior determinação dos ácidos
654 graxos voláteis (AGV). Foi determinado por cromatografia gasosa, segundo método
655 preconizado por Barbosa et al. (2001). Foi utilizado um cromatógrafo a gás
656 (ThermoFinnigan, modelo Trace GC Ultra, com detector de ionização de chama
657 (FID)), equipado com coluna Nukol ligada a ácidos graxos livres, de 30 m de
658 comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 μm de espessura. O gás de arraste utilizado
659 foi o Hélio (He) a 0,8 mL min^{-1} .

660 Para a determinação do desaparecimento da MS e da FDN adotou-se a técnica
661 do saco de náilon, com tecido de 50 μm de porosidade, confeccionado nas dimensões de
662 7 x 14 cm, selados nas bordas e devidamente identificados. Após serem pesados,
663 receberam cinco gramas do feno (moído a 2 mm). Cada saco teve seu peso com a
664 amostra registrado e preso a uma argola de metal atada firmemente por meio de um
665 elástico para seu fechamento. Os sacos, com as amostras e presos à argola, foram
666 embebidos primeiramente em água por uma hora e posteriormente presos a uma
667 corrente de metal de 50 cm ligada a uma âncora de 600 g. Em seguida foram
668 introduzidos no rúmen via cânula sempre às 07:00 h (antes do arraçoamento) e retirados
669 após o tempo estipulado para incubação (120, 96, 72, 48, 24, 12, 6 e 3 horas).

670 Retirados do rúmen, estes foram imediatamente imersos em água fria e lavados
671 em máquina de lavar por cinco minutos durante três ciclos. Em seguida foram
672 colocados em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C onde permaneceram por 72
673 horas. Após este tempo foram retirados da estufa para esfriamento em dessecador e
674 posterior pesagem. Os sacos foram incubados do 15º ao 19º dia de cada período
675 experimental.

676 A fração solúvel “a” do feno contida nos sacos de náilon foi determinada
677 mantendo-se os sacos em água a 38°C por uma hora, depois de lavados e secos foram
678 pesados, sendo a diferença entre os pesos inicial e final considerada como a fração
679 solúvel determinada para cada período experimental, que corresponderam aos valores
680 da zero hora nas curvas de degradação da matéria seca do feno.

681 As taxas de degradação da MS e FDN por hora “c” foram determinadas com
682 base na fração insolúvel potencialmente degradável (fração “b”), que foi obtida após a
683 subtração da porção solúvel (fração “a”) e insolúvel (parte não degradada). A fração “c”
684 foi então considerada como a inclinação obtida após a realização de uma regressão
685 linear simples do logaritmo neperiano “ln” das degradações da fração “b” ao longo dos
686 tempos de incubação.

687 As degradabilidades efetivas (DE) da MS e da FDN foram calculadas de acordo
688 com Ørskov e McDonald (1979), em que $DE = a + (b \times c) / (c + k)$, sendo “k” a taxa de
689 passagem de sólidos estimada no rúmen, considerada, no presente estudo como $0,02 \text{ h}^{-1}$,
690 conforme sugerido por Huntington e Givens (1995).

691 A digestibilidade aparente dos nutrientes foi realizada do 15º ao 19º dia de cada
692 período experimental e estimada através do método de coleta total de fezes, sendo
693 obtida pela diferença entre o consumido da dieta pelo animal e o que foi excretado nas
694 fezes. As fezes foram coletadas imediatamente após a defecação, pesadas e amostradas
695 (100 g kg^{-1}) em intervalos de 6 horas e posteriormente congeladas. Ao final dos
696 períodos experimentais as amostras foram pré-secas, pesadas e homogeneizadas,
697 procedendo-se então à moagem (1mm) para posteriores análises laboratoriais. As baias
698 foram limpas regularmente para garantir que não houvesse contaminação das fezes com
699 urina ou partículas grosseiras da dieta.

700 A digestibilidade *in vitro* foi determinada segundo metodologia de Tilley e Terry
701 (1963) adaptada para Ankom Daisy system (Ankom Technology Corp. Macedon, NY,
702 USA) descrita por Holden (1999). Foi pesado 0,5 g de substrato moído (2 mm) e
703 acondicionado em sacos de TNT (25 cm²) previamente numerados e pesados, em
704 triplicata. Estes sacos foram colocados em 4 jarros com válvula de Bunsen (respeitando
705 limite de no máximo 30 sacos por jarro, sendo 2 destes sem amostra para correção de
706 impurezas) contendo aproximadamente 1,6 litros de solução tampão (Solução tampão A
707 (g/L): 10.0 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g NaCl, 0,1 g CaCl₂·2H₂O e 0,5 g ureia;
708 Solução B (g/100 mL): 15g Na₂CO₃; 1,0 g Na₂S·9H₂O). Estas soluções foram
709 misturadas com relação B:A de 1:5, afim de obter um pH final de 6.8. Em seguida, 400
710 mL de líquido ruminal de cada bovino (coado e transportado em recipiente térmico)
711 foram adicionados aos jarros e aplicado CO₂.

712 Os jarros permaneceram incubados com agitação e temperatura constante de
713 39°C por 48 horas. Após 48 horas, foram adicionados 40 mL de HCl (6N) e 8 g de
714 pepsina por jarro, permanecendo incubados e em agitação por mais 24 horas. Ao final,
715 os jarros foram drenados, os sacos lavados com água destilada no próprio jarro, e
716 colocados em estufa a 105 °C por 16 horas para secagem. Depois deste período, foram
717 pesados para se determinar a MS pós-incubação e destinados às análises
718 bromatológicas. Os coeficientes de digestibilidade *in vitro* dos nutrientes (MS, MO, PB
719 e FDN) foram obtidos através da equação: $DIV (g/kg) = ((g \text{ nutriente incubado} - (g \text{ nutriente residual} - g \text{ branco})) / (g \text{ nutriente incubado})) \times 1000$.

721 Para análise da produção cumulativa de gases *in vitro*, o equipamento AnkomRF
722 Gas Production System (Ankom Technology, NY, USA) foi utilizado. O sistema conta
723 com 24 frascos equipados com sensores de pressão (faixa de pressão: -69, +3447 kPa;
724 resolução: 0,27 kPa; precisão $\pm 0,1 \%$ do valor medido) ligados via wireless a um

725 computador. As amostras (feno e concentrado) moídas a 1 mm, foram incubadas em
726 triplicata. Em cada frasco (310 mL) foram adicionados $0,5000 \pm 0,0008$ g de amostra,
727 100 mL de solução tampão pré-aquecida a 39 °C e 25 mL de fluido ruminal coletado em
728 recipiente térmico dos 4 bovinos.

729 Para proporcionar ambiente anaeróbio, antes de acoplar o sensor de pressão ao
730 frasco, este foi purgado com CO₂. Os frascos equipados com os sensores de pressão
731 permaneceram em agitação e temperatura constante de 39°C. A pressão (psi) de cada
732 frasco foi determinada e registrada a cada 5 minutos durante 48 horas, sendo ao final
733 processadas para produção cumulativa de gases (mL de gás/100 mg de MS incubada).
734 Os parâmetros da cinética de produção de gás foram obtidos por meio do modelo
735 logístico bicompartimental proposto por Schofield et al. (1994): $Y = A/\{1+\exp[2+4*B*(Lag-t)]\}+D/\{1+\exp[2+4*E*(Lag-t)]\}$, onde: Y = volume total de gás no tempo t
736 (extensão da degradação); A = volume de gás (mL) de degradação rápida; D = volume
737 de gás (mL) de degradação lenta; B = taxa de degradação da fração rápida (/hora); E =
738 taxa de degradação da fração lenta (/hora); e Lag = tempo de colonização das bactérias
739 (h).
740

741 As análises bromatológicas do concentrado, feno, sobras e fezes, foram
742 realizadas segundo as metodologias da AOAC (1995) para MS (967.03), PB (981.10),
743 MM (942.05) EE (920,29), e de Van Soest (1991) para fibra em detergente neutro
744 (corrigido para cinzas e proteína - FDNcp) e FDA.

745 Para análises das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos (alanina
746 amino transferase - ALT, aspartato amino transferase - AST, albumina, gama glutamil
747 transferase - GGT, ureia, proteínas totais e creatinina kinase - CK), 5 mL de sangue
748 foram coletados em tubos contendo gel separador e ativador de coágulo, da cauda de
749 cada animal, em jejum e às 7:00 horas no último dia de cada período experimental.

Após homogeneização o sangue foi centrifugado a 3000 rpm, durante 15 minutos para obtenção do soro e posteriormente analisado por analisador automático (Roche Cobas C111 Germany), utilizando-se *kits* comerciais (Roche Diagnostics Germany).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico SAS Student. Os dados de consumo, digestibilidade aparente e parâmetros sanguíneos foram analisados utilizando um delineamento em Quadrado Latino 4 x 4. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + A_k + e_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} = observação do efeito do tratamento i no período j , do animal k , μ média geral, T_i = efeito do tratamento i , em que $i = 1$ (0g OS), 2 (1,25g OS), 3 (2,5g OS) e 4 (3,75g OS); P_j = efeito do período j ($j = 4$ períodos); A_k = efeito do animal k ($k = 4$ animais) e e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

Para a degradação *in situ* da MS e FDN e variáveis ruminais pH, N-NH₃ e AGV foi considerado um delineamento em quadrado latino com parcelas subdivididas, onde as parcelas foram os tratamentos e as subparcelas os tempos de incubação das amostras no rúmen ou os diferentes horários de amostragem de líquido ruminal. O modelo incluiu os efeitos de tratamento, tempo de incubação, animal, período e tratamento x tempo para a taxa de degradação *in situ* da MS e FDN. Para as variáveis ruminais pH, N-NH₃ e AGV, o modelo estatístico incluiu os efeitos de tratamento, horários de amostragem, animal, período e tratamento x horário. O modelo estatístico utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + H_j + A_k + P_l + (TH)_{ij} + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijkl} = observação do efeito do tratamento i para horas de incubação (taxa de degradação) ou horário de coleta (variáveis ruminais) j no animal k ; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento em que $i = 1$ (0g OS), 2 (1,25g OS), 3 (2,5g OS) e 4 (3,75g OS); H_j = efeito dos horários de incubação para desaparecimento ($j = 1, \dots, 8$) ou horário de

775 coleta para variáveis ruminais ($j = 1, \dots, 7$); A_k = efeito do animal ($k = 1, \dots, 4$), Pl =
776 efeito do período ($l = 1, \dots, 4$); TH_{ij} = interação entre tratamento i e tempo j ; e e_{ijkl} =
777 erro aleatório associado a cada observação.

778 Quando observadas diferenças significativas, as médias foram comparadas
779 utilizando teste Tukey a 0,05 de significância. E quando essas foram significativas, foi
780 testada a regressão linear e quadrática.

781 Os dados de digestibilidade *in vitro* foram submetidos a análises de variância
782 usando procedimento GLM do SAS de acordo com o delineamento inteiramente
783 casualizado. As médias foram comparadas pelo teste Duncan, em nível de 0,05 de
784 significância.

785 O procedimento de Gauss-Newton foi utilizado para análise de dados da
786 produção cumulativa *in vitro* de gases, estimando os parâmetros de fermentação. O
787 sistema de Estatística e Análise Genética (UFV, 1997) foi utilizado, e as médias
788 comparadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

789

790 **Resultados**

791 Não houve efeito da inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira nos
792 suplementos, sobre a ingestão da matéria seca do feno (MS feno), matéria seca total
793 (MS total), proteína bruta do feno (PB feno), proteína bruta total (PB total), fibra em
794 detergente neutro do feno (FDN Feno), fibra em detergente neutro total (FDN total),
795 matéria orgânica do feno (MO feno) e matéria orgânica total (MO total) em kg dia^{-1} e g
796 kg^{-1} PC (Tabela 2).

797 Não houve efeito significativo para o coeficiente de digestibilidade aparente
798 (Tabela 3) e *in vitro* (Tabela 4) da MS, MO e FDN corrigida para cinzas e proteína
799 (FDNcp), porém houve efeito sobre as digestibilidade aparente e *in vitro* da PB (g kg^{-1}

MS) com a inclusão do óleo essencial, sendo para digestibilidade aparente, 768,0 para o tratamento controle, 702,5 para o tratamento com 1,25 g de óleo essencial, 676,1 para 2,5 g OS e 699,9 para o tratamento com 3,75g de OS (Tabela 3) e para *in vitro*, 887,9; 921,8; 904,9 e 939,1, nos respectivos tratamentos (Tabela 4).

Para as variáveis ruminiais de degradação da FDN e da MS (Tabela 5), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para as frações “b” e “c” tanto da FDN como da MS, sendo o mesmo verificado para a degradabilidade efetiva (DE) destes componentes.

Nas Figuras 1 e 2, verificou-se diferença significativa entre os tempos de incubação no rúmen tanto para o desaparecimento da MS como para o desaparecimento da FDN, mas sem apresentar interação do tratamento com o tempo. A degradação da FDN e da MS se mantiveram estáveis até 6 horas de incubação em todos os tratamentos, com posterior aumento até 120 horas.

Para produção cumulativa de gases *in vitro* não houve efeito sobre os parâmetros A, B, D, E e TOTAL da cinética de degradação com a inclusão do óleo. Porém, houve efeito sobre o tempo de colonização microbiana (h) que se apresentou mais baixo no tratamento controle (Tabela 6).

Não foram encontradas interações entre os tratamentos e os horários de coleta para os valores de pH e N-NH₃ ruminal. Do mesmo modo, não houve diferenças significativas entre os tratamentos para os valores de pH (Tabela 7) e N-NH₃ (Tabela 8).

Foram encontradas diferenças significativas para os valores de pH nos diferentes horários de coleta (Tabela 7), onde, os maiores valores observados foram entre 2 e 4 horas após o fornecimento da dieta (09:00 e 11:00 horas) para todos os tratamentos, decrescendo com o passar do tempo após a alimentação (6,86 a 6,03).

Houve diferença significativa para as concentrações de N-NH₃ nos diferentes horários de coleta, com pico entre 2 e 4 horas após a suplementação (09:00 e 11:00 horas) para todos os tratamentos, decrescendo até obter seus valores mínimos 12 horas após o fornecimento do suplemento, permanecendo baixo até o arraçoamento do dia subsequente, sendo 4,93 e 4,71 mg dL⁻¹, respectivamente. O N-NH₃ ruminal teve uma amplitude de 4,71 a 33,89 mg dL⁻¹, com média de 16,3 mg de N-NH₃ dL⁻¹ de líquido ruminal (Tabela 8).

Não houve efeito sobre as concentrações (mmol L⁻¹) de ácido acético (C2), ácido propiônico (C3), ácido n-butírico (nC4), ácido n-valérico (nC5), ácido n-capróico (nC6) e sobre a soma total de ácidos graxos de cadeia curta. Porém, houve efeito nas concentrações de ácido isobutírico (iC4 - 0,67; 0,81; 0,71 e 0,80 mmol L⁻¹) e ácido isovalérico (iC5 - 0,91; 1,14; 1,21 e 1,11 mmol L⁻¹) com a inclusão de óleo de sucupira-preta em relação ao tratamento controle (sem adição de óleo) (Tabela 9).

Para as variáveis sanguíneas séricas, albumina (ALB), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina (CR), gama glutamil transferase (GGT), proteínas totais (PT) e ureia, não foram encontrados efeitos com a inclusão do óleo essencial de sucupira-preta (Tabela 10).

841

842

843

844

845

Discussão

Os efeitos de óleos essenciais na ingestão da MS (IMS) e dos outros nutrientes ainda não estão bem estabelecidos. Coletivamente, os resultados observados em diversos estudos, sugerem que os efeitos dos óleos essenciais e seus componentes sobre a ingestão de alimentos pelos ruminantes variam dependendo do tipo e da dose dos óleos essenciais e de diferenças na composição da dieta basal fornecida aos animais (Cobelli et al., 2016).

851 No presente estudo não houve efeito sobre o consumo de MS, FDN, PB e MO
852 (Tabela 2), o que corrobora com os resultados encontrados por Benchaar et al. (2006;
853 2007), onde não foram observados alterações no consumo de matéria seca (CMS),
854 produção e composição do leite de vacas leiteiras alimentadas com 750 mg ou 2g com a
855 mistura diária de componentes de óleos essenciais. Assim como, Hristov et al. (2013)
856 também não observaram efeito significativo no CMS de vacas alimentadas com níveis
857 de extrato de orégano. Porém, Yang et al. (2010) relataram que a suplementação
858 dietética com cinamaldeído aumentou o CMS de bovinos em confinamento (no início
859 do período de engorda), mas não afetou o CMS após 4 semanas de confinamento.

860 Fatores como a degradação dos compostos no rúmen, adaptação microbiana ao
861 óleo, taxa de passagem para o duodeno, volatilização e absorção dos compostos pela
862 parede ruminal são responsáveis por considerável parcela das divergências entre os
863 ensaios (Villalba e Provenza, 2010).

864 Embora a digestibilidade aparente e *in vitro* do total de nutrientes (exceto PB)
865 não tenha sido afetada pela inclusão do óleo essencial de sucupira-preta na dieta,
866 observa-se que a digestibilidade aparente de todos os nutrientes neste estudo foi
867 semelhante aos resultados obtidos em estudos similares. Benchaar et al. (2006, 2007,
868 2008) apresentaram digestibilidade da MS, MO e PB maiores que 60,0% e
869 digestibilidade da FDN e FDA de mais de 52,0%, enquanto o presente estudo *in vivo*
870 resultou em quantidades digeríveis de MS, MO, PB e FDN superiores a 60% (Tabela 3).

871 Beauchemin et al. (1994) e, Buxton e Redfearn (1997) relataram que quando
872 ocorre ruptura dos tecidos estruturais via ruminação, permite-se de forma semelhante o
873 acesso bacteriano ao substrato, proporcionando maior área de superfície de contato,
874 adesão e formação de biofilme, e desse modo, pode-se explicar resultados não
875 significativos para a digestibilidade da MS.

876 Contudo, a digestibilidade da dieta depende de vários fatores inter-relacionados,
877 como as taxas de passagem e de digestão dos ingredientes da dieta e o seu efeito
878 associativo com o óleo (Van Soest, 1994), o que pode ter sido uma das causas da menor
879 digestibilidade da PB no trato total. Molero et al. (2004) também sugerem que os efeitos
880 dos óleos essenciais no metabolismo podem resultar da inibição da atividade
881 proteolítica ou uma diminuição no apego e colonização das partículas do alimento por
882 microrganismos proteolíticos e que pode ocorrer uma diminuição na degradação da
883 proteína no rúmen, como também ocorreu na digestibilidade *in vitro* (Tabela 4).

884 Lin et al. (2013) testando 0,5 ou 1,0 g d⁻¹ de uma combinação de compostos
885 ativos de óleos essenciais (eugenol, carvacrol, citral e cinamaldeído), não observaram
886 diferenças na digestibilidade da MS, FDN e FDA, entre os tratamentos, porém houve
887 redução na digestibilidade da PB para os três tratamentos que incluíram as misturas de
888 óleos essenciais. Segundo os autores, a adição dos óleos essenciais pode aumentar o
889 fluxo de proteína alimentar no intestino e melhorar a eficiência de utilização de
890 proteínas alimentares. O que corrobora os resultados aqui observados (768,0 para o
891 tratamento controle, 702,5 para o tratamento com 1,25 g de óleo essencial, 676,1 para
892 2,5 g OS e 699,9 para o tratamento com 3,75g de OS (Tabela 3)).

893 Estudos tem demonstrado que a ação dos óleos essenciais sobre os
894 microrganismos ruminais apresentam diferentes efeitos sobre a degradação da MS e das
895 frações fibrosas da dieta no rúmen (Cobellis et al., 2016).

896 O presente experimento não evidenciou efeito sobre a degradabilidade da MS e
897 da FDN da dieta (Tabela 5). Em contra partida, Tager e Krause (2011), ao avaliarem
898 uma mistura de óleos essenciais, observaram diferença sobre a degradação da FDN com
899 a inclusão dos óleos essenciais, mesmo não observando efeito sobre a digestibilidade
900 dos nutrientes. Segundo os autores como não houve alteração na digestibilidade total de

901 MS e FDN parece que a depressão *in situ* do FDN pode ter sido compensada pós-
902 ruminalmente.

903 Em relação ao desaparecimento da MS e FDN não houve diferença entre os
904 tempos de 3 e 6 horas de incubação que normalmente correspondem ao *Lag-time* com
905 adesão, colonização e início da fermentação bacteriana para os volumosos (Figura 1 e
906 2). A partir das seis horas de exposição à degradação ruminal o desaparecimento
907 aumentou gradativamente até 120 horas de exposição, com médias de 68,51; 66,23;
908 69,84 e 67,39% de desaparecimento ruminal da MS do feno para os tratamentos 0g OS,
909 1,25g OS, 2,5g OS e 3,75g OS, respectivamente, neste tempo máximo de incubação
910 ruminal.

911 A média do volume de gás produzido, independente do nível de inclusão de óleo
912 foi de 15,27 ml 100 mg⁻¹ MS incubada (Tabela 6). Foi observado que a produção
913 cumulativa de gases *in vitro* (Tabela 6) segue uma similaridade entre os resultados
914 observados na degradação da MS e FDN (Tabela 5), onde não houve efeito nas
915 variáveis analisadas, porém, houve efeito no tempo de colonização microbiana com a
916 inclusão do óleo, assim como nos resultados observados nas Figuras 1 e 2. De acordo
917 com Brow et al. (2002), a técnica de produção de gás simula a fermentação ruminal, e
918 pode ser utilizados para prever o padrão de fermentação e degradação no rúmen, o que
919 corrobora os resultados observados no presente experimento.

920 Os valores de pH para todos os tratamentos permaneceram próximos ao pH
921 normal de 5,8 a 7,0 para o bom funcionamento do rúmen conforme proposto por Santos
922 (2006), sendo o maior valor de 6,9 observado para o tratamento 1,25g OS, duas horas
923 após a alimentação e o menor valor de 5,9 para o tratamento com 0g OS às 15:00 e
924 19:00 horas (Tabela 7).

925 As médias de pH observadas para todos os tratamentos permaneceram próximas
926 ao valor de 6,4 o qual é considerado como ótimo para o crescimento microbiano (Van
927 Soest, 1994). Porém, as 8, 10 e 12 horas após a suplementação foram observados
928 valores inferiores a este, o que poderia acarretar em limitação da digestão da fibra
929 devido a redução do número de microrganismos celulolíticos quando o pH ruminal
930 encontra-se abaixo de 6,2 (Grant e Mertens, 1992). No, entanto, o baixo pH observado
931 nestes horários não foi suficiente para afetar a digestibilidade da MS e FDN neste
932 trabalho (Tabela 3).

933 Os estudos conduzidos por Benchaar et al. (2007, 2008), Meyer et al. (2009),
934 Tassoul e Shaver (2009), Tager e Krause (2011) e Hristov et al. (2013) corroboram os
935 dados acima apresentados, uma vez que estes autores não observaram diferença para os
936 valores de pH ruminal ao testarem diferentes fontes de óleos essenciais comerciais.

937 Segundo os resultados observados verifica-se que houve um sincronismo entre
938 os horários de maior pH com os de maior concentração de N-NH_3 ruminal,
939 demonstrando relação entre horários de suplementação e as variáveis analisadas.

940 As concentrações de N-NH_3 (Tabela 8) se mantiveram acima de 6 mg dL^{-1} para
941 todos os tratamentos das 09:00 as 17:00 horas. Porém, às 07:00 e às 19:00 horas os
942 valores obtidos ($4,71$ e $4,93 \text{ mg dL}^{-1}$) sugerem que possa ter ocorrido limitação na
943 degradação da fibra, pois os valores mínimos de N-NH_3 ruminal para que não se tenha
944 esse tipo de limitação se encontram em 5 mg dL^{-1} (Slyter et al., 1979). A diminuição na
945 concentração de amônia ruminal pode ser também, indicativa de aumento da síntese de
946 proteína microbiana nesses horários (Tedeschi et al., 2000).

947 Busquet et al. (2006), ao avaliarem alguns óleos essenciais (óleo de alho, de
948 anis, de canela, gengibre, orégano, de pimenta e cravo da índia), observaram que houve
949 diminuição das concentrações de NH_3 *in vitro*, utilizando-se doses elevadas (3000 mg L^{-1}

950 ¹), porém, os efeitos não se mantiveram em doses moderadas (300 mg L⁻¹) e foram
951 inexistentes em doses mais baixas (3 mg L⁻¹). De acordo com os autores, esses
952 resultados demonstram que a composição química e dosagem do óleo essencial podem
953 influenciar nos efeitos sobre o metabolismo do N ruminal.

954 Com isso, para cada dieta há um valor ótimo de concentração amoniacal
955 correspondente, pois a capacidade de síntese proteica e a captação de amônia dependem
956 da taxa de fermentação dos carboidratos e maiores taxas de fermentação determinam
957 maiores eficiências, permitindo níveis de amônia relativamente maiores (Van Soest,
958 1994), como ocorreu na presente pesquisa 4 horas após a suplementação.

959 Ao se analisar diversos estudos observa-se que a atividade antimicrobiana de
960 vários óleos essenciais comporta-se como pH dependente, tendo sua atividade
961 potencializada em pH baixo (próximo de 5,5) (Castillejos et al., 2006 e Rodriguez Prado
962 et al., 2012). Isto acontece devido ao estado hidrofílico das moléculas ativas. À medida
963 que o pH diminui, as moléculas tendem a se tornar não dissociadas e interagem mais
964 facilmente com as membranas celulares bacterianas, exercendo o seu efeito
965 antimicrobiano (Cardozo et al., 2005).

966 No presente estudo, o pH manteve-se dentro da normalidade (6,4) e não foi
967 observado diferença nas concentrações totais de C2 e C3 (Tabela 9). Já no trabalho de
968 Cardozo et al. (2005) em pH 5,5, o cinamaldeído (óleo essencial da canela) aumentou a
969 concentração total de ácido graxo de cadeia curta (AGCC) e diminuiu a relação C2:C3.
970 Entretanto, em pH 7,0 este óleo essencial exerceu o efeito oposto, diminuindo a
971 concentração total de AGCC e aumentando a relação C2:C3.

972 Resultados semelhantes foram relatados por Castillejos et al. (2006) utilizando
973 doses de 5, 50, 500 e 5000 mg L⁻¹ de alguns óleos essenciais (eugenol, timol, guaiacol,
974 limoneno e vanilina). E o aumento do pH com 500 mg L⁻¹ de timol foi consistido em

975 uma depressão na concentração total de acetato, propionato, lactato e metano, sugerindo
976 que a fermentação microbiana do rúmen foi inibida por causa da atividade
977 antimicrobiana do timol.

978 Houve efeito de tratamento sobre o aumento nas concentrações de isobutirato
979 (iC4 - 0,67; 0,81; 0,71 e 0,80 mmol L⁻¹) e isovalerato (iC5 - 0,91; 1,14; 1,21 e 1,11
980 mmol L⁻¹) (Tabela 9). A formação desses dois ácidos graxos de cadeia ramificada
981 (AGCR) ocorre a partir da fermentação de aminoácidos de cadeia ramificada, como a
982 valina e leucina pelas bactérias aminolíticas (Russell, 2002).

983 Esses AGCR são produzidos e liberados para o fluido ruminal, principalmente
984 pelas bactérias com alta atividade desaminativa, e são substratos essenciais para o
985 crescimento das bactérias que degradam os carboidratos fibrosos. Nesse processo,
986 NAD⁺ é reduzida à NADH, mas as reações e enzimas envolvidas na desaminação e
987 descarboxilação oxidativa não são claramente conhecidas (Kozloski, 2011).

988 Tekippe et al. (2013) ao trabalharem com vacas em lactação utilizando um óleo
989 essencial comercial (525 mg d⁻¹), também não verificaram efeito na concentração de
990 AGCC. Porém, como no presente estudo, observou-se efeito nas concentrações de
991 isobutirato e isovalerato. Nesse contexto, verifica-se a eficácia de alguns óleos
992 essenciais em atuar na deaminação dos aminoácidos valina e leucina.

993 Os resultados detectados nas variáveis séricas (Tabela 10) indicam que a
994 inclusão do óleo não tem influência sobre a função de órgãos (fígado e rins) associados
995 às substâncias sanguíneas testadas nesta pesquisa.

996 A concentração de nitrogênio ureico no sangue está altamente correlacionada
997 com a concentração de N-NH₃ do rúmen (Petit e Flipot, 1992, Davidson et al., 2003). A
998 síntese de ureia no fígado é realizada a partir de amônia absorvida pelo rúmen, sendo
999 assim, a amônia ruminal em excesso do requerimento microbiano é absorvida pela

parede do rúmen para o sangue portal e a maior parte é convertida em ureia no fígado. Como não foram observadas alterações na concentração de N-NH₃ (Tabela 8), alterações nas concentrações séricas de ureia também não foram evidenciadas (Tabela 10).

Swenson e Reece (1996), consideram valor de nitrogênio ureico entre 10 e 30 mg dL⁻¹ normais para bovinos, no presente estudo, os valores de ureia encontrados permanecem na média de 24,14 mg dL⁻¹, abaixo de limite superior. Porém, segundo Valadares et al. (1997), a concentração de N ureico para a máxima eficiência microbiana varia de 12,5 a 15 mg dL⁻¹, sendo que acima desses valores poderia ocorrer uma perda de proteína no processo de fermentação ruminal.

1010

1011 **Conclusão**

1012

O óleo essencial da semente de sucupira-preta apresenta efeito positivo de modulação da fermentação ruminal nas primeiras 4 horas, estimulando as bactérias aminolíticas em produzir isoácidos de cadeia curta para crescimento de bactérias fibrolíticas. Esse efeito temporário resultou num melhor aproveitamento do FDN de volumoso de baixa qualidade, na manutenção do pH em dietas com maior proporção de grãos, porém aumentou negativamente a fermentação de proteína bruta.

Seriam necessários mais estudos em relação à adaptação das bactérias ao óleo e no tipo e forma de fornecimento dos mesmos para que seu efeito seja permanente e que se tenha a possibilidade de prevenir acidose em dietas com alta proporção de concentrado.

1023

1024

Referências Bibliográficas

- 1025
- 1026 AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. 1995. Official methods of analysis. 16th
1027 ed. AOAC International, Arlington, VA.
- 1028 Barbosa, N. G. S.; Lana, R. P.; Jham, G. N.; Borges, A. C.; Mâncio, A. B.; José Carlos Pereira,
1029 J. C.; Oliveira, J. S. 2001. Consumo e Fermentação Ruminal de Proteínas em Função de
1030 Suplementação Alimentar Energética e Protéica em Novilhos. Revista brasileira de
1031 Zootecnia 30:1558-1565.
- 1032 Beauchemin, K. A.; McAllister, T. A.; Dong, Y.; Farr B. I; Cheng, K. J. 1994. Effects of
1033 mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. Journal of Animal Science 72:236-
1034 246.
- 1035 Benchaar, C.; Petit, H. V.; Berthiaume, R.; Whyte, T. D.; Chouinard, P. Y. 2006. Effects of
1036 addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk
1037 production, and milk composition in dairy cows. Journal of Dairy Science 89:4352-4364.
- 1038 Benchaar, C.; Petit, H. V.; Berthiaume, R.; Ouellet, D. R.; Chiquette, J.; Chouinard, P. Y. 2007.
1039 Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations,
1040 milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage.
1041 Journal of Dairy Science 90:886-897.
- 1042 Benchaar, C., McAllister, T. A.; Chouinard, P. Y. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate
1043 protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho
1044 condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. Journal of Dairy Science 91:4765-
1045 4777.
- 1046 Brown, V. E.; Rymer, C.; Agnew, R. E.; Givens, D. I. 2002. Relationship between *in vitro* gas
1047 production profiles of forages and *in vivo* rumen fermentation patterns in beef steers fed
1048 those forages. Animal Feed Science and Technology 98:13-24.
- 1049 Burt, S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a
1050 review. 2004. International Journal of Food Microbiology 94:223-253.
- 1051 Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen
1052 microbial fermentation. Journal of Dairy Science 89:761-771.
- 1053 Buxton, D. R.; Redfearn, D. D. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. Journal
1054 of Nutrition 127:814-818 (supl.).
- 1055 Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P. W.; Castillejos, J.; Ferret, A. 2007. Invited review:
1056 essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science
1057 90:2580-2595.
- 1058 Cardozo, P. W.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. 2005. Screening for the effects of natural
1059 plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate
1060 diet for beef cattle. Journal of Animal Science. 83:2572-2579.
- 1061 Castillejos, L.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. 2006. Effect of essential oil active compounds on
1062 rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. Journal of Dairy
1063 Science 89:2649-2658.
- 1064 Cobellis, G.; Trabalza-Marinucci, M.; Yu, Z. 2016. Critical evaluation of essential oils
1065 as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Science of the Total
1066 Environment 545-546:556-568.
- 1067 Davidson, S., Hopkins, B. A.; Diaz, D. E.; Bolt, S. M.; Brownie, C.; Fellner, V.; Whitlow, L.
1068 W. 2003. Effects of amounts and degradability of dietary protein on lactation, nitrogen
1069 utilization, and excretion in early lactation Holstein cows. Journal of Dairy Science
1070 86:1681-1689.

- 1071 Dorman, D. H.; Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of
1072 plant volatile oils. *Journal Applied Microbiology* 88: 308–316.
- 1073 FDA. Food and Drug Administration. 2006. Risk Assessment of Streptogramin Resistance in
1074 *Enterococcus faecium* Attributable to the Use of Streptogramins in Animals. Food and Drug
1075 Administration, Center for Veterinary Medicine.
- 1076 Feitosa, J. G. R.; Silva, E. S.; Rodrigues, M.O.; Alves, P. B. 2004. Atividade antimicrobiana do
1077 óleo essencial de *Bowdichia virgilioides* pelo método de difusão em placa. XXVII Reunião
1078 Anual da Sociedade Brasileira de Química. Salvador, Brasil.
- 1079 Fenner, H. 1965. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam
1080 distillation. *Journal of Dairy Science* 48:249–251.
- 1081 Grant, R. J.; Mertens, D. R. 1992. Influence of butter pH and raw corn starch addition on *in*
1082 *vitro* fiber digestion kinetics. *Journal of Dairy Science* 75:2762-2768.
- 1083 Holden, L. A. 1999. Comparison of methods of *in vitro* matter digestibility for ten feeds.
1084 *Journal of Dairy Science*, 2:1791–1794.
- 1085 Hristov, A. N.; Lee, C.; Cassidy, T.; Heyler, K.; Tekippe, J. A.; Varga, G. A.; Brandt, R. C.
1086 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk
1087 fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 96:1189-1202.
- 1088 Huntington, G. B.; Givens, D. I. 1995. The *in situ* technique for studying the rumen degradation
1089 of feeds: A review of the procedure. *Nutrition Abstract and Reviews* 65:63-93.
- 1090 Kozloski, G. V. 2011. *Bioquímica dos ruminantes*. 3. Ed. Santa Maria: Ed. da UFSM.
- 1091 Lin, B.; Lu, Y.; Salem, A. Z. M.; Wang, J. H.; Liang, Q. and Liu, J. X. 2013. Effects of essential
1092 oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate
1093 included. *Animal Feed Science and Technology* 184:24-32.
- 1094 Meyer, N. F.; Erickson, G. E.; Klopfenstein, T. J.; Greenquist, M. A.; Luebke, M. K.; Williams,
1095 P.; Engstrom, M. A. 2009. Effect of essential oils, tylosin, and monensin on finishing steer
1096 performance, carcass characteristics, liver abscesses, ruminal fermentation, and digestibility.
1097 *Journal of Animal Science* 87:2346-2354.
- 1098 Molero, R.; Ibars, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Losa, R. 2004. Effects of a specific blend of
1099 essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets
1100 with different forage to concentrate ratios. *Animal Feed Science and Technology* 114:91-
1101 104.
- 1102 Ørskov, E. R.; McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from
1103 incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural*
1104 *Science* 92:499-503.
- 1105 Petit, H. V., Flipot, P. M. 1992. Feed utilization of beef steers fed grass as hay or silage with or
1106 without nitrogen supplementation. *Journal of Animal Science* 70:876-883.
- 1107 Rodriguez-Pardo, M.; Ferret, A.; Zwieten, J.; Gonzales, L.; Bravo, D.; Calsamiglia, S. 2012.
1108 Effects of dietary addition of capsicum extract on intake, water consumption, and rumen
1109 fermentation of fattening heifers fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*
1110 90:1879-1884.
- 1111 Russell, J. B.; Strobel, H. J. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and*
1112 *Environmental Microbiology* 55:1-6.
- 1113 Russell, J. B.; Mantovani, H. C. 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as
1114 an alternative to antibiotics. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4:347-
1115 55.
- 1116 Santos, F. A. P. 2006. Metabolismo de proteínas. In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S.
1117 G. (Ed.) *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, p.255-284.

- 1118 Sas Institute. SAS System for windows. Student Version. Cary: SAS Institute Inc. 1999.
- 1119 Schofield, P.; Pitt, R. E.; Pell, A. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production.
1120 Journal Animal Science. 72:2980-2991.
- 1121 Slyter, L. L., Satter, L. D., Dinius, D. A. 1979. Effect of ruminal ammonia concentration on
1122 nitrogen utilization by steers. Journal of Animal Science 48:906-912.
- 1123 Swenson, M. J.; Reece, W. O. 1996. Dukes fisiologia dos animais domésticos. 11 ed. Rio de
1124 Janeiro: Guanabara Koogan.
- 1125 Tager, L. R.; Krause, K. M. 2011. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk
1126 production, and feeding behavior in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 94:
1127 2455-2464.
- 1128 Tassoul, M. D.; Shaver, R. D. 2009. Effect of a mixture of supplemental dietary plant essential
1129 oils on performance of periparturient and early lactation dairy cows. Journal of Dairy
1130 Science 92:1734-1740.
- 1131 Tedeschi, L. O.; Fox, D. G.; Russell, J. B. 2000. Accounting for the effects of a ruminal
1132 nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein System.
1133 Journal Animal Science 78:1648-1658.
- 1134 Tekippe, J. A.; Tacoma, R.; Hristov, A.N.; Lee, C.; Oh, J.; Heyler, K. S.; Cassidy, T.
1135 W.; Varga, G. A.; Bravo, D. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and
1136 lactation performance of dairy cows. Journal of Dairy Science 96:7892-7903.
- 1137 Tilley, J. M. A. e Terry, R. A. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage
1138 crops. Journal of the Brazilian Chemical Society 18:104-111.
- 1139 Valadares, R. F. D.; Gonçalves, L. C., Rodriguez, N. M. 1997. Níveis de proteína em dietas de
1140 bovinos. Consumo e digestibilidade aparente totais e parciais. Revista brasileira de
1141 zootecnia 26:1252-1258.
- 1142 Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Symposium: carbohydrate methodology,
1143 metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Journal of Dairy Science 74:3583-
1144 3597.
- 1145 Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University
1146 Press.
- 1147 Villalba, J. J.; Provenza, F. D. 2010. Challenges in extrapolating *in vitro* findings to *in vivo*
1148 evaluation of plants resources. In: Vercoe, P. E.; Makkar, H. P. S.; Schlink, A. C. (Ed.). *In*
1149 *vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and
1150 related methodologies. London: Springer.
- 1151 Wohlt, J. E.; Fiallo, J. F.; Miller, M. E. 1981. Composition of by-products of the essential-oil
1152 industry and their potential as feeds for ruminants. Animal Feed Science and Technology
1153 6:115-121.
- 1154 Yang, W. Z.; Benchaar, C.; Ametaj, B. N.; Beuchemin, K. A. 2010. Dose response to eugenol
1155 supplementation in growing beef cattle: Ruminal fermentation and intestinal digestion.
1156 Animal Feed Science and technology 158:57-64.
- 1157
- 1158
- 1159
- 1160
- 1161

Tabelas e Figuras

Tabela 1- Composição químico-bromatológica do suplemento e do feno *Panicum maximum* cv. Massai

Variável	Suplemento Concentrado ¹	Feno
Composição Bromatológica (g kg ⁻¹ de MS)		
MS	943,7	932,4
MO	917,5	927,8
PB	146,9	27,6
FDN	193,1	763,2
FDA	53,9	437,0
EE	32,9	9,0
MM	77,8	63,7
CNF ²	727,2	138,0

MS= matéria seca; MO = matéria orgânica; PB = proteína bruta; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; EE = extrato etéreo e MM = matéria mineral.

¹Composição do suplemento concentrado (g kg⁻¹): milho grão (810 g), farelo de soja (160 g), ureia (15 g) e minerais (15 g). Níveis de garantia do suplemento concentrado (g ou mg kg⁻¹): Ca – máx: 18 g, mín - 12 g; P – máx: 5 g; Na – mín: 3,7 g; S – mín: 1,5 g; Zn – mín: 70,5 mg; F – máx: 50 mg; Cu – mín: 28 mg; Mn – mín: 12 mg; I – mín: 1,40 mg; Co – mín: 0,94 mg; Se – mín: 0,23 mg.

²CNF = 100 – (PB + MM + FDNcp + EE) e o suplemento concentrado CNF = 100 – ((PB – PB derivada da ureia + inclusão de ureia) + MM + FDNcp + EE) (Hall, 2000).

1186

1187

1188

1189 Tabela 2 - Ingestão (kg d⁻¹ e g kg⁻¹ de PC) de MS, PB, FDN e MO de feno de capim
 1190 *Panicum maximum* cv. Massai em novilhos submetidos a diferentes níveis de
 1191 inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta

1192

Ingestão	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta				EPM	P-value
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
	Kg d ⁻¹					
MS Feno	4,53	4,67	4,45	4,05	0,2558	0,4222
MS Total	11,09	11,44	11,04	10,78	0,1148	0,1381
PB Feno	0,12	0,12	0,12	0,10	0,0001	0,2051
PB Total	1,08	1,12	1,07	1,08	0,0005	0,0564
FDN Feno	3,78	3,89	3,73	3,39	0,2081	0,4413
FDN Total	5,05	5,22	4,99	4,68	0,1517	0,3447
MO Feno	4,21	4,34	4,15	3,77	0,2424	0,4547
MO Total	10,23	10,51	10,23	9,962	0,1068	0,2353
	g kg ⁻¹ PC					
MS Feno	8,95	9,12	8,90	8,07	0,6201	0,5158
MS Total	21,93	22,30	22,05	21,32	0,6191	0,4790
PB Feno	0,23	0,24	0,23	0,20	0,0007	0,3233
PB Total	2,14	2,02	2,15	2,13	0,0022	0,2177
FDN Feno	7,46	7,60	7,44	6,74	0,7225	0,5298
FDN Total	9,97	10,19	9,95	9,29	0,6643	0,4876
MO Feno	8,31	8,46	8,28	7,52	0,5864	0,5499
MO Total	20,21	20,48	20,42	19,70	0,6742	0,5669

1193

1194 MS: matéria seca, PB: proteína bruta, FDN: fibra em detergente neutro, MO: matéria orgânica.
 1195 Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS:
 1196 2,5g de óleo essencial kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS. PC: peso corporal, EPM:
 1197 erro padrão da média.

1198

1199

1200

1201

1202 Tabela 3 - Coeficiente de digestibilidade aparente da MS, MO, PB e FDNcp da dieta de
 1203 novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da
 1204 semente de sucupira-preta na dieta

Digestibilidade	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta				EPM	P-value
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
Digestibilidade em g kg ⁻¹ de MS						
MS	746,7	719,8	686,6	707,5	1,76	0,2116
MO	738,6	709,6	674,7	698,8	1,88	0,2183
PB ¹	768,0 ^A	702,5 ^{AB}	676,1 ^B	699,9 ^{AB}	0,01	0,0329
FDNcp	652,3	632,7	586,0	604,9	0,02	0,4347

1205 Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). MS: matéria seca,
 1206 MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, FDNcp: fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e
 1207 proteína. EPM: erro padrão da média. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g
 1208 de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial
 1209 kg⁻¹ MS.

1210 ¹ Y (linear) = 0,78 – 0,03 x tratamento (R² = 0,51; P = 0,0028); Y (quadrática) = 0,87 – 0,12 x tratamento
 1211 + 0,02 x tratamento² (R² = 0,66; P = 0,0016).

1212

1213 Tabela 4 - Coeficiente de digestibilidade ruminal *in vitro* da MS, MO, PB e FDN do
 1214 feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai e do suplemento concentrado
 1215 em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais
 1216 da semente de sucupira-preta na dieta

Digestibilidade (g kg ⁻¹ de MS)	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta				EPM	P-value
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
Feno						
DIVMS	466,6	478,8	462,1	470,8	6,45	0,9329
DIVMO	448,7	465,9	443,3	455,5	6,65	0,8558
DIVFDN	705,2	696,3	696,7	693,6	3,51	0,8654
DIVPB	367,7	312,2	338,2	293,7	8,58	0,1843
Concentrado						
DIVMS	929,6	940,4	941,7	929,2	28,85	0,5839
DIVMO	926,0	938,8	940,0	925,4	30,15	0,4835
DIVFDN	958,1	966,6	970,6	967,8	13,85	0,1873
DIVPB	887,9 ^d	921,8 ^b	904,9 ^c	939,1 ^a	33,79	0,0045

1217 Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente (P<0,05). DIV:
 1218 digestibilidade *in vitro*; MS: matéria seca, MO: matéria orgânica, PB: proteína bruta, FDN: fibra em
 1219 detergente neutro. EPM: erro padrão da média. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g
 1220 OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo
 1221 essencial kg⁻¹ MS.

Tabela 5-Estimativa das variáveis ruminais de degradação da fibra em detergente neutro (FDN) e da matéria seca (MS) do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta

a - fração solúvel; b - fração insolúvel potencialmente degradável; c - taxa de degradação (h^{-1}); DE - degradação efetiva ($0,02 \text{ h}^{-1}$); EPM: erro padrão da média. Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS.

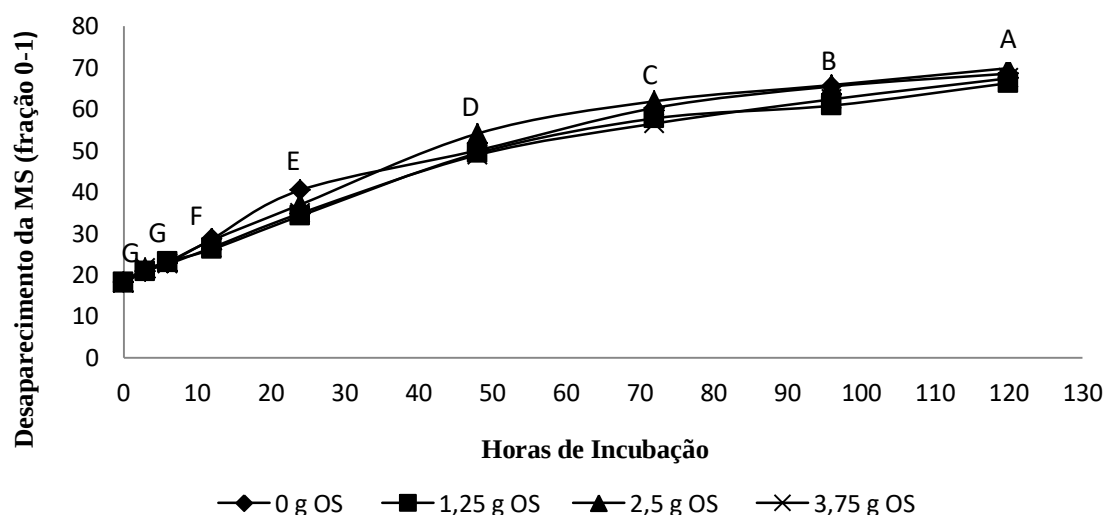


Figura 1 - Desaparecimento (fração 0-1) da matéria seca (MS) do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai no rúmen de bovinos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS.

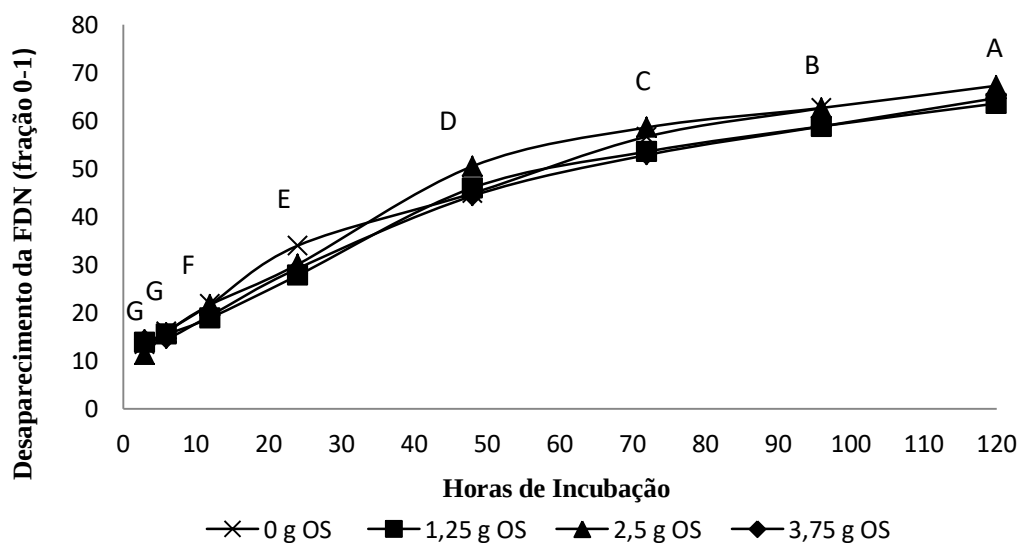


Figura 2 - Desaparecimento (fração 0-1) da fibra em detergente neutro (FDN) do feno de capim *Panicum maximum* cv. Massai no rúmen de bovinos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta. Médias seguidas de letras diferentes se diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS.

Tabela 6 – Parâmetros estimados da produção cumulativa de gases *in vitro* em líquido ruminal de bovinos, submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta

Parâmetros da fermentação	Nível de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta				EPM	P- value
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
A ($\text{mL } 100\text{mg}^{-1}$ MS incubada)	4,31	3,54	3,61	3,73	0,002	0,544
B (h^{-1})	45,13	41,76	40,55	40,04	0,021	0,536
Lag (h) ¹	4,48 ^a	4,82 ^b	5,18 ^c	5,21 ^d	0,001	0,049
D ($\text{mL } 100\text{mg}^{-1}$ MS incubada)	11,92	11,97	10,66	11,33	0,003	0,337
E (h^{-1})	4,82	5,10	4,50	4,73	0,001	0,505
Total ($\text{mL } 100\text{mg}^{-1}$ MS incubada)	16,23	15,51	14,27	15,06	0,004	0,390

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente ($P < 0,05$). EPM = erro padrão da média; ¹Lag = $4,543 + 0,202 \times \text{tratamento}$ ($R^2 = 0,99$); A = produção cumulativa de gases das frações de rápida fermentação ($\text{mL}/100 \text{ mg}$ de MS incubada); B = taxa de fermentação da fração A ($\%/hora$); Lag = Lag-time = tempo de colonização microbiana (horas); D = produção cumulativa de gases das frações de lenta fermentação ($\text{mL}/100 \text{ mg}$ de MS incubada); E = taxa de fermentação da fração D; Total = produção cumulativa de gases ($\text{mL}/100 \text{ mg}$ de MS incubada). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg^{-1} MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg^{-1} MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg^{-1} MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg^{-1} MS.

1259 Tabela 7–Médias dos quadrados mínimos e erros padrões das médias do pH do líquido
 1260 ruminal em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos
 1261 essenciais da semente de sucupira-preta na dieta

Horário de coleta	pH				Médias	
	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta					
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
07:00	6,77 ± 0,12	6,17 ± 0,12	6,74 ± 0,12	6,71 ± 0,12	6,73 ± 0,06 ^A	
09:00	6,82 ± 0,12	6,90 ± 0,12	6,83 ± 0,12	6,89 ± 0,12	6,86 ± 0,06 ^A	
11:00	6,56 ± 0,12	6,73 ± 0,12	6,63 ± 0,12	6,72 ± 0,12	6,66 ± 0,06 ^A	
13:00	6,35 ± 0,12	6,26 ± 0,12	6,23 ± 0,12	6,33 ± 0,12	6,29 ± 0,06 ^B	
15:00	5,89 ± 0,12	6,07 ± 0,12	6,12 ± 0,12	6,03 ± 0,12	6,03 ± 0,06 ^C	
17:00	6,13 ± 0,12	6,14 ± 0,12	6,23 ± 0,12	6,06 ± 0,12	6,14 ± 0,06 ^{BC}	
19:00	5,98 ± 0,12	6,01 ± 0,12	6,06 ± 0,12	6,15 ± 0,12	6,05 ± 0,06 ^{BC}	
Médias	6,36 ± 0,05	6,40 ± 0,05	6,40 ± 0,05	6,41 ± 0,05		

1262 Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (Tukey, P <.0001). Tratamentos: 0g OS:
 1263 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial
 1264 kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS.
 1265

1266 Tabela 8–Médias dos quadrados mínimos e erros padrões das médias do N-NH₃ ruminal
 1267 (mg dL⁻¹) em novilhos submetidos a diferentes níveis de inclusão de óleos
 1268 essenciais da semente de sucupira-preta na dieta

Horário de coleta	N-NH ₃				Médias	
	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta					
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
07:00	5,12 ± 2,80	4,24 ± 2,80	4,03 ± 2,80	5,46 ± 2,80	4,71 ± 1,40 ^D	
09:00	27,05 ± 2,80	33,45 ± 2,80	26,04 ± 2,80	30,34 ± 2,80	29,22 ± 1,40 ^A	
11:00	31,49 ± 2,80	38,23 ± 2,80	29,72 ± 2,80	36,11 ± 2,80	33,89 ± 1,40 ^A	
13:00	24,70 ± 2,80	23,17 ± 2,80	18,60 ± 2,80	14,46 ± 2,80	20,23 ± 1,40 ^B	
15:00	12,25 ± 2,80	15,21 ± 2,80	13,97 ± 2,80	12,45 ± 2,80	13,47 ± 1,40 ^C	
17:00	6,96 ± 2,80	6,27 ± 2,80	9,18 ± 2,80	8,20 ± 2,80	7,65 ± 1,40 ^{CD}	
19:00	5,64 ± 2,80	3,06 ± 2,80	6,18 ± 2,80	4,85 ± 2,80	4,93 ± 1,40 ^D	
Médias	16,17 ± 1,06	17,66 ± 1,06	15,39 ± 1,06	15,98 ± 1,06		

1269 Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (Tukey, P <.0001). Tratamentos: 0g OS:
 1270 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial
 1271 kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS.
 1272

1273 Tabela 9- Efeito da inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta
 1274 de bovinos suplementados com concentrado na produção de ácidos graxos
 1275 voláteis de cadeia curta no rúmen

Ácidos graxos (mmol L ⁻¹)	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta				EPM	P-value
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
C2	85,66	85,04	81,86	84,09	2,15	0,5728
C3	22,21	20,59	19,10	19,11	1,16	0,2103
iC4	0,67 ^b	0,81 ^a	0,71 ^{ab}	0,80 ^a	0,02	0,0007
nC4	12,58	12,93	12,62	13,84	0,54	0,3522
iC5	0,91 ^b	1,14 ^a	1,21 ^a	1,11 ^a	0,45	0,0001
nC5	0,77	0,83	0,86	0,93	0,05	0,1456
nC6	0,21	0,24	0,27	0,32	0,04	0,3822
Soma Total de AGV	123,05	121,62	116,67	120,24	2,72	0,4007

1276 C2 = ácido acético, C3 = ácido propiônico, iC4 = ácido isobutírico, nC4 = ácido n-butírico, iC5 = ácido
 1277 isovalérico, nC5 = ácido n-valérico, nC6 = ácido n-capríico. EPM= erro padrão da média. Médias
 1278 seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si (Tukey, P<0,05). Tratamentos: 0g OS: 0g de
 1279 óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg⁻¹
 1280 MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS.
 1281

1282

1283 Tabela 10– Parâmetros bioquímicos séricos em novilhos submetidos a diferentes níveis
 1284 de inclusão de óleos essenciais da semente de sucupira-preta na dieta

1285

Variáveis sanguíneas	Níveis de inclusão de óleo essencial de sucupira-preta				EPM	P-value
	0g OS	1,25g OS	2,5g OS	3,75g OS		
ALB	37,00	35,00	36,50	35,00	1,03	0,4547
ALT	26,25	24,27	23,07	22,97	1,55	0,4538
AST	69,45	52,90	62,06	55,35	3,27	0,0578
CR	1,38	1,32	1,35	1,42	1,37	0,6420
GGT	19,22	14,40	15,22	16,75	1,14	0,0915
PT	73,30	70,27	71,95	73,97	2,87	0,8092
UREIA	27,05	20,72	23,15	25,67	1,76	0,1545

1286

1287 ALB: Albumina (g dL⁻¹), ALT: alanina aminotransferase (UI L⁻¹), AST: aspartato aminotransferase (UI
 1288 L⁻¹), CR: creatinina (mg dL⁻¹), GGT: Gama glutamil transferase (UI L⁻¹), PT: proteínas totais (g dL⁻¹),
 1289 UREA: ureia (mg dL⁻¹). Tratamentos: 0g OS: 0g de óleo essencial kg⁻¹ MS; 1,25g OS: 1,25g de óleo
 1290 essencial kg⁻¹ MS; 2,5g OS: 2,5g de óleo essencial kg⁻¹ MS e 3,75g OS: 3,75g de óleo essencial kg⁻¹ MS.