

Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 11:1-12. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2021.9>
Artigo Original. Recebido: 21/02/2020. Aceito: 20/01/2021. Publicado: 10/02/2021. Chave:2020-50.

Modificação da fermentação ruminal *in vitro* para mitigação de metano pela adição de óleos essenciais de plantas e compostos terpenóides

Modification of ruminal fermentation *in vitro* for methane mitigation by adding essential oils from plants and terpenoid compounds

Lucía Delgadillo-Ruiz^{1*}ID, Rómulo Bañuelos-Valenzuela^{2} ID, Perla Gallegos-Flores¹ID, Francisco Echavarría-Cháirez³ID, Carlos Meza-López²ID, Norma Gaytán-Saldaña¹ID**

¹Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica, CP. 98068, Zacatecas, Zacatecas, México. ²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Zacatecas, México. *Autor responsável: Lucía Delgadillo-Ruiz. **Autor para correspondência: Rómulo Bañuelos-Valenzuela. Carretera Panamericana Fresnillo-Zacatecas s/n, Centro, CP. 98500 Víctor Rosales, Zacatecas, México. luciadeldgadillo@uaz.edu.mx, apozolero@hotmail.com, perla_gf17@hotmail.com, fechava1@yahoo.com, carmezlop@yahoo.com.mx, gaytanangelica1@gmail.com

RESUMO

Os óleos essenciais das plantas são compostos aromáticos voláteis, principalmente terpenóides, fenilpropanóides; monoterpênos, sesquiterpênos e álcoois, estes apresentam uma ampla gama de atividade antimicrobiana e antioxidante, portanto, a adição de óleos essenciais de cravo, eucalipto, menta, alecrim, orégano e canela podem modificar a fermentação ruminal reduzindo a população de bactérias produtoras de metano e assim redução na produção desse gás. O objetivo foi avaliar diferentes óleos essenciais e compostos terpenóides para melhorar a fermentação ruminal e a produção de ácidos graxos voláteis, atenuando a geração de metano. A composição química (terpenóides) dos óleos, assim como os ácidos graxos voláteis (AGVs), foram determinados por cromatografia gasosa. Para a digestibilidade *in vitro*, foi utilizada a técnica de produção de gases *in vitro* e o líquido ruminal. O metano foi inferido da concentração de AGVs. Verificou-se que todos os óleos essenciais apresentaram cada um dos terpenóides em diferentes concentrações, relatando a maior concentração de carvacrol no óleo essencial de cravo (303 mg mL⁻¹) e no orégano (1,20 mg mL⁻¹); o terpineno apresentou-se em maior quantidade no óleo essencial de hortelã-pimenta (4,83 mg mL⁻¹); para o óleo de hortelã-pimenta e alecrim, o linalol foi maior e para o limoneno a maior concentração foi no óleo de eucalipto (449 mg mL⁻¹) e alecrim (12,42 mg mL⁻¹). Para a produção de gases nas digestibilidades, o óleo essencial de eucalipto na dose de 0,3 apresentou 176 mL g⁻¹ MS. Para a digestibilidade *in vitro*, o óleo de alecrim em altas doses (0,6 mL) apresentou a melhor fermentação ruminal, pois teve melhor mitigação de metano (716,83 mM/L) sem afetar negativamente a concentração de AGVs (acetato, 1892,2; propiônico, 526,14; butírico, 24,99 mM/L), assim como os terpenóides timol, linalol e limoneno em altas doses. Conclui-se que a melhor fermentação ruminal *in vitro* com mitigação de metano foi observada com óleo de alecrim e para os terpenóides os compostos foram timol, linalol e limoneno na alta dose.

Palavras-chave: Plantas, Compostos terpenóides, Ácidos graxos voláteis e Metano.

ABSTRACT

Essential oils from plants are volatile aromatic compounds, mainly terpenoids, phenylpropanoids; monoterpenes, sesquiterpenes, and alcohols, these present a wide range of antimicrobial and antioxidant activity, so the addition of essential oils of clove, eucalyptus, mint, rosemary, oregano, and cinnamon can modify ruminal fermentation by reducing the population of bacteria producing methane and thus have a reduction in the production of this gas. The objective of this work was to evaluate different essential oils and terpenoid compounds to improve ruminal fermentation and the production of volatile fatty acids, attenuating the generation of methane. The chemical composition (terpenoids) of the oils, as well as volatile fatty acids (VFAs), were determined by gas chromatography. For *in vitro* digestibility, the *in vitro* gas production technique was used, and the ruminal liquid was used. Methane was inferred from the concentration of VFAs. It was found that all the essential oils presented each one of the terpenoids in different concentrations, reporting the highest concentration of carvacrol in the essential oil of clove (303 mg mL⁻¹) and oregano (1.20 mg mL⁻¹); terpinene was presented in greater quantity in the essential oil of peppermint (4.83 mg mL⁻¹); for peppermint and rosemary oil, linalool was higher and for limonene, the highest concentration was in eucalyptus oil (449 mg mL⁻¹) and rosemary (12.42 mg mL⁻¹). For gas production in digestibility, eucalyptus essential oil at a dose of 0.3 presented 176 mL g⁻¹ DM. For *in vitro* digestibility, rosemary oil in high dose (0.6 mL) presented the best ruminal fermentation since it had better methane mitigation (716.83 mM/L) without negatively affecting the concentration of VFAs (acetate, 1892.2; propionic, 526.14; butyric, 24.99 mM/L), as well as terpenoids like thymol, linalool, and limonene in high doses. It is concluded that the best *in vitro* ruminal fermentation with methane mitigation was observed with rosemary oil and the terpenoid compounds were thymol, linalool, and limonene in the high dose.

Keywords: Plants, Terpenoid compounds, Volatile fatty acids, and Methane.

INTRODUÇÃO

Plantas aromáticas ou arbustivas têm sido amplamente utilizadas empiricamente na medicina tradicional para tratar diferentes condições de saúde (Cruz *et al.*, 2017; Yuan *et al.*, 2016), no entanto, os efeitos destas têm gerado interesse nos sistemas de produção pecuária, desde com a implementação de aditivos vegetais, a fermentação ruminal pode ser efetivamente modificada pela inibição da desaminação e metanogênese que resulta numa redução de metano entérico (CH₄), NH₃-N e acetato, e portanto, uma concentração maior de propionato e butirato será produzida; bem como uma diminuição no CH₄ entérico, que é um importante gás de efeito estufa (Kurniawati *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015).

Os óleos essenciais de plantas (OEP) são compostos aromáticos voláteis, constituídos por uma mistura de metabólitos secundários (MS); principalmente compostos terpênicos, fenilpropanóides; monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois, aldeídos, éteres, ésteres, cetonas e fenóis; que são os principais responsáveis pelo aroma (Bakkali *et al.*, 2008). Os OEPs possuem ampla atividade antimicrobiana e antioxidante (Gallegos-Flores *et al.*, 2019), por isso têm gerado interesse como alternativa natural ao uso de compostos químicos para modificar a fermentação ruminal, desde a implementação de aditivos sintéticos tem sido limitada pelo aparecimento de resíduos em produtos para consumo humano, ou pela resistência gerada por certos microrganismos devido ao uso não terapêutico de antibióticos (ionóforos) em ruminantes (Brown *et al.*, 2017; Estévez e Cutuli, 2011). Alguns dos principais compostos OEP mais comuns incluem: timol e

carvacrol (tomilho e orégano), eugenol (cravo), pineno (zimbros), limoneno (endro), 1,8-cineol (eucalipto), cinamaldeído (canela), capsaicina (pimenta), terpineno (árvore do chá), alicina (alho) e anetol (anis) (Kurniawati *et al.*, 2020).

Existem plantas aromáticas que têm sido utilizadas como especiarias comestíveis e cujos óleos essenciais são ricos em compostos terpenóides com forte atividade antimicrobiana, que podem afetar o desenvolvimento e o crescimento de bactérias ruminantes e inibir a metanogênese. Entre os óleos estão: canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), hortelã-pimenta (*Mentha spicata*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Salvia rosmarinus*) (Condo *et al.*, 2018; Firmino *et al.*, 2018; Dhakad *et al.*, 2017) Dada a preocupação com a produção de gases de efeito estufa que contribuem para o aquecimento global, principalmente o metano emitido por ruminantes, faz-se necessário investigar o uso de óleos essenciais, uma vez que possuem efeito antibacteriano. Deduz-se que influenciam a microbiota do rúmen e, portanto, modificam a fermentação e diminuem a concentração de metano.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar diferentes óleos essenciais e compostos terpenóides, para aumentar a fermentação ruminal e a produção de ácidos graxos voláteis, atenuando a geração de metano.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Foram utilizadas plantas de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), hortelã-pimenta (*Mentha spicata*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Salvia rosmarinus*).

Obtenção de óleos essenciais de plantas

As amostras de óleo essencial foram obtidas a partir da amostra desidratada por hidrodestilação por 2 h, em sistema de Clevenger modificado. Durante o processo de fervura, o material seco absorve a água e o óleo essencial se difunde pelas paredes celulares por osmose, sendo vaporizado e levado pela corrente do evaporador (Teixeira *et al.*, 2013).

Composição química determinada por cromatografia gasosa

Foi determinado por meio de um cromatógrafo de gás (CG; Agilent Technologies série 6890N), usando a coluna polar DB_WAXetr. As condições de trabalho eram; temperatura após a injeção 250 °C a uma pressão de 12,13 psi com um fluxo de He 36,5 mL min⁻¹. As condições para a coluna eram; temperatura inicial 50 °C de zero a dois minutos, com aumento de 10 °C até atingir 250 °C, utilizando um detector de chama ionizante (DCHI) na temperatura de 210 °C com fluxo de H₂ de 40 mL min⁻¹ e um fluxo de ar de 450 mL min⁻¹; previamente foi feita uma curva de calibração. Os padrões usados foram grau reagente da marca Sigma Aldrich: carvacrol, timol, limoneno, linalol e terpineno, com

porcentagem de pureza de 98, 99,5, 98, 97 e 85% respectivamente. Cada uma das determinações foi realizada em triplicado [Bañuelos et al. \(2018\)](#).

Preparação de compostos terpenóides

Os compostos terpenóides utilizados para a digestibilidade *in vitro* foram aqueles utilizados como padrão no reagente CG da marca Sigma Aldrich: carvacrol, timol, limoneno, linalol e terpineno preparados com etanol 50%.

Determinação da produção de gás *in vitro*

A alimentação das ovelhas para produção de gases *in vitro* foi utilizada no fluido ruminal de duas ovelhas peludas, canuladas e alimentadas com dieta contendo 83% de feno (50% de alfafa e 50% de palha de trigo) e 17% de concentrado (63% de milho moído, 25 % de farinha, 5,5% de carbonato de cálcio, 5,5% de mono-fosfato de cálcio, 0,5% de pré-mistura de vitaminas A, D e E e 0,5% de microminerais). A alimentação era fornecida diariamente às 08h00 e 16h00 com acesso gratuito a água. As ovelhas foram alimentadas por 30 dias antes da extração do fluido ruminal, como época de adaptação à ração.

Produção de gás *in vitro*

Os óleos foram adicionados individualmente em cada um dos frascos de digestibilidade em diferentes volumes ([Ugbogu et al., 2019](#)); O substrato de alfafa foi utilizado como controle sem adição de aditivos. A produção de gás *in vitro* foi determinada pelo método proposto por [Theodorou et al. \(1994\)](#); para o qual foram utilizadas unidades de fermentação (UF) de 120 mL para cada amostra. No registro do gás produzido, foi utilizado um medidor de pressão da marca Sper Scientific. A pressão do gás foi cumulativa e determinada em unidades de pressão (Psi); o tempo de medição foi de 3, 6, 9, 12, 24 e 48 h; para cada volume dos diferentes óleos, realizando três repetições.

Determinação de ácidos graxos voláteis no fluido ruminal

Os AGVs (acético, propiônico e butírico) foram quantificados por cromatografia gasosa. As condições de trabalho eram; a temperatura de entrada após a injeção da amostra é de 50 °C a uma pressão de 12,13 psi com um fluxo de He 36,5 mL min⁻¹. As condições para a coluna eram; temperatura inicial 50 °C, de 0 a 2 minutos com aumento de 10 °C por minuto até atingir 250 °C, mantendo esta temperatura constante por 5 minutos, e depois caindo para 50 °C mantendo por 2 minutos com fluxo de I tem 1,6 mL min⁻¹ a uma pressão de 12,13 psi e uma velocidade média de 25 cm s⁻¹. Um detector de chama ionizante (DCHI) foi usado a uma temperatura de 210 °C com um fluxo de H₂ de 40 mL min⁻¹ e um fluxo de ar de 450 mL min⁻¹. Foi realizada previamente uma curva de calibração e os padrões utilizados foram o grau de reagente da marca Sigma Aldrich: acético, propiônico e butírico, com percentuais de pureza de 99,5, 98 e 99% respectivamente. Cada uma das determinações foi realizada em triplicado.

Determinação de metano

O metano foi inferido a partir da concentração do AGV, por meio da aplicação de modelos matemáticos não lineares estabelecidos por [Moss et al. \(2000\)](#), onde é apontado que a produção de CH₄ pode ser calculada estequiometricamente, usando a seguinte equação:

$$[CH_4] = 0.45 C_2(\text{acetato}) - 0.275 C_3(\text{propionato}) + 0.4 C_4(\text{butirato})$$

Análise estatística

A análise estatística para a produção de gases, ácidos graxos voláteis e metano foi realizada por meio de análise de variância, em delineamento inteiramente casualizado e teste de médias de Tukey; usando o pacote estatístico SPSS® para avaliar diferenças estatísticas (p <0,05) (Cytel Software, 2010). As fontes de variação consideradas foram óleos essenciais e compostos terpenóides; para os ácidos graxos voláteis, foram considerados como variáveis: ácido acético, propiônico e butírico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), hortelã-pimenta (*Mentha spicata*), orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Salvia rosmarinus*), observou-se que a maior concentração de carvacrol e o timol está presente nos óleos de cravo-da-índia (carvacrol 303 mg mL⁻¹) e orégano (carvacrol, 1.652 mg mL⁻¹; timol, 0,247 mg mL⁻¹) (Tabela 1). Tem sido relatado que esses dois compostos apresentam efeito antibacteriano contra bactérias gram negativas e positivas, para as quais se sabe que o mecanismo de ação é o de se embutir na membrana da célula bacteriana, causando a desintegração dessa estrutura, seguida de lise celular ([Rodríguez-García et al., 2015](#); [Friedman, 2014](#); [Béjaoui et al., 2013](#); [García-García et al., 2011](#)). Portanto, esse efeito antibacteriano pode influenciar a população da microbiota ruminal e, portanto, modificar a fermentação ruminal.

Tabela 1. Compostos terpenóides presentes em óleos essenciais analisados por cromatografia gasosa

| ÓLEO | Carvacrol mg mL ⁻¹ | Timol mg mL ⁻¹ | Linalol mg mL ⁻¹ | Terpineno mg mL ⁻¹ | Limoneno mg mL ⁻¹ |
|-----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| Óleo essencial de canela | 0.0375 | 0.0108 | 0.047 | 0.1431 | 2.5167 |
| Óleo essencial de cravo | 303 | 0.0068 | 0.0383 | 0.2753 | 1.5496 |
| Óleo essencial de eucalipto | 0.07 | 0.0142 | 0.4621 | 0.8725 | 499 |
| Óleo essencial de hortelã-pimenta | 0.0169 | 0.025 | 3.9401 | 4.8388 | 9.56 |
| Óleo essencial de orégano | 1.652 | 0.2474 | 0.0878 | 0 | 0.1449 |
| Óleo essencial de alecrim | 0.0524 | 0.0753 | 8.865 | 0.3725 | 12.425 |

[Nile et al. \(2017\)](#) relatam que os óleos essenciais são ricos em terpenos (carvacrol, citral, linalol e geraniol); e compostos fenólicos coincidindo no presente trabalho, uma vez que ambos os compostos foram encontrados. [Albado et al. \(2001\)](#) relataram a presença de

compostos terpenóides, fenóis e compostos metabolicamente relacionados ao carvacrol em óleos essenciais de orégano; portanto, esta pesquisa coincide com o presente estudo, uma vez que os terpenóides no óleo de orégano (carvacrol, timol e linalol), embora em diferentes concentrações. [Bañuelos et al. \(2018\)](#) citam que os terpenóides constituíram 11,2% do óleo com α -pineno (1,3%), limoneno (3%) e 1,8-cineol (2,9%), como os principais monoterpênos no óleo essencial de orégano e *R. graveolens*. A presença de limoneno na presente investigação coincidiu com esses resultados.

Os compostos identificados são importantes para a sua atividade farmacológica; por exemplo, o limoneno é antibacteriano, antifúngico, anti-séptico e antiviral; o timol é antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, antioxidante, anti-reumático e anti-séptico; carvacrol é antibacteriano, antifúngico, antiinflamatório, anti-séptico, antiespasmódico e expectorante ([Sorentino e Landmesser, 2005](#)).

Na técnica de digestibilidade *in vitro*, a maior obtenção de gás na técnica de digestibilidade *in vitro* (tabela 2) foi observada no óleo essencial de eucalipto em suas três doses (0,1 = $157,59 \pm 3,62$ mL g⁻¹ de MS, 0,3 = $176,86 \pm 1,10$ mL g⁻¹ MS e 0,6 = $175,30 \pm 3,62$ mL g⁻¹ MS), [Wang et al. \(2016\)](#) relataram que ao utilizar extratos de plantas medicinais nem sempre há tendência de aumento da concentração de gás ruminal (mL g⁻¹ MS); pois alguns deles podem ter o efeito oposto.

Em compostos terpenóides, uma baixa produção de gás é observada para a dose de 0,6 mL, registrando $48,24 \pm 3,41$, $29,77 \pm 4,87$, $28,63 \pm 0,50$, $28,98 \pm 3,09$ e $29,80 \pm 3,12$ mL g⁻¹ MS \pm DP (timol, carvacrol, linalol, limoneno e terpineno, respectivamente). [Chouhan et al. \(2017\)](#) y [Gallegos-Flores et al. \(2019\)](#) relatam que os metabólitos secundários (terpenóides) das plantas são reconhecidos como agentes antimicrobianos que atuam contra bactérias, protozoários e fungos. Portanto, esse efeito se reflete na baixa produção de gases, pois inibe o crescimento de bactérias metanogênicas ruminais, sendo os ácidos acético, propiônico e butírico aqueles que são gerados em maior quantidade durante a fermentação dos substratos no rúmen.

A concentração de gás (total), AGV's e CH₄ é apresentada na (tabela 3). A produção de ácido propiônico foi completamente inibida nos óleos essenciais de eucalipto e orégano (dose 0,1); enquanto nos compostos terpenóides, a produção de gás foi inibida no timol, dose 0,3; carvacrol 0,6; linalol 0,3; limoneno 0,1 e 0,3 e terpineno 0,1; exceto óleo essencial de alecrim (dose 0,1). Todas as doses diminuíram a produção de ácido propiônico em comparação com o controle de alfafa. A produção de ácido butírico foi inibida no óleo essencial de cravo e canela nas doses de 0,1 e 0,3; enquanto a maior produção de butírico foi apresentada no limoneno na dose de 0,1 ($684,93 \pm 0,09$ mM/L \pm DP), porém acético e a produção propiônica é inibida.

[Sejian et al. \(2015\)](#) apontam que 40 a 60% do total de gases de efeito estufa (GEE) da pecuária são provenientes da fermentação entérica, do manejo de dejetos e das diferentes atividades relacionadas à obtenção de alimentos para animais. Portanto, os

compostos terpenóides mostram uma diminuição no metano; é o caso do limoneno na dose de 0,1, apresentando alta produção de ácido butírico, mas inibição de ácido acético e propiônico.

Tabela 2. Produção de gás com as diferentes doses de óleos e terpenóides

| Amostra | Dosis (mL) | Producción de gas total en mL g ⁻¹ MS±DP | | | | | |
|-----------------------------------|------------|---|------------|-------------|-------------|--------------|-------------|
| | | 3 h | 6 h | 9 h | 12 h | 24 h | 48 h |
| Óleo essencial de alecrim | 0.1 | 11.67±0.14 | 28.52±0.46 | 51.13±1.44 | 75.38±2.29 | 108.57±0.16 | 144.94±1.44 |
| | 0.3 | 11.87±1.85 | 27.87±3.56 | 49.09±6.15 | 72.13±9.32 | 108.80±10.17 | 146.98±5.55 |
| | 0.6 | 9.26±0.04 | 22.84±6.01 | 40.39±15.97 | 58.95±28.24 | 94.41±10.17 | 139.13±3.73 |
| Óleo essencial de cravo | 0.1 | 6.39±5.12 | 11.42±5.90 | 17.91±1.07 | 22.64±1.35 | 28.22±10.49 | 35.76±6.15 |
| | 0.3 | 9.15±1.96 | 15.39±2.81 | 19.42±1.07 | 20.72±1.35 | 21.58±4.69 | 22.48±9.39 |
| | 0.6 | 9.31±0.11 | 14.34±0.75 | 17.81±1.14 | 19.01±1.21 | 19.77±1.28 | 20.72±1.24 |
| Óleo essencial de eucalipto | 0.1 | 13.63±2.31 | 33.90±4.23 | 61.06±6.26 | 88.38±7.61 | 122.18±10.49 | 157.59±3.62 |
| | 0.3 | 16.90±0.96 | 39.89±2.28 | 69.92±3.98 | 99.14±4.45 | 137.02±3.09 | 176.86±1.10 |
| | 0.6 | 15.54±5.69 | 36.67±7.86 | 64.28±5.39 | 92.85±4.45 | 132.64±13.00 | 175.30±3.62 |
| Óleo essencial de hortelã-pimenta | 0.1 | 8.50±3.45 | 18.01±2.19 | 27.26±0.59 | 33.50±3.72 | 45.97±11.79 | 65.29±4.49 |
| | 0.3 | 9.26±0.53 | 14.64±2.38 | 20.93±4.48 | 23.29±7.22 | 24.85±4.94 | 26.26±7.60 |
| | 0.6 | 7.49±1.24 | 11.42±2.28 | 14.24±4.73 | 15.39±5.58 | 16.20±6.12 | 16.80±6.69 |
| Óleo essencial de orégano | 0.1 | 13.38±0.71 | 21.10±0.82 | 26.43±0.92 | 28.24±0.84 | 29.30±0.78 | 30.66±0.82 |
| | 0.3 | 14.39±1.64 | 22.26±2.40 | 27.74±2.60 | 29.43±2.38 | 30.41±2.15 | 31.82±1.96 |
| | 0.6 | 12.07±2.28 | 18.86±3.79 | 24.07±4.41 | 26.06±4.52 | 27.36±4.48 | 29.05±4.68 |
| Óleo essencial de canela | 0.1 | 14.11±3.22 | 24.47±8.41 | 31.71±2.72 | 34.58±37.90 | 35.91±3.68 | 37.88±9.66 |
| | 0.3 | 14.18±0.05 | 22.01±1.74 | 27.87±2.72 | 29.83±3.36 | 30.73±3.66 | 32.39±3.88 |
| | 0.6 | 15.29±0.78 | 24.22±1.56 | 30.31±1.73 | 32.44±1.85 | 33.70±2.10 | 35.66±2.31 |
| Timol | 0.1 | 1.95±0.37 | 5.03±0.53 | 10.04±1.20 | 33.74±4.08 | 41.26±4.49 | 47.99±4.92 |
| | 0.3 | 2.34±0.04 | 5.37±0.06 | 9.89±0.46 | 31.84±2.53 | 39.17±3.13 | 45.83±3.55 |
| | 0.6 | 2.14±0.14 | 4.79±0.70 | 9.28±1.16 | 31.82±3.22 | 40.19±3.91 | 48.24±3.41 |
| Carvacrol | 0.1 | 2.17±0.04 | 5.01±0.12 | 9.68±0.43 | 14.97±0.46 | 22.28±0.15 | 28.47±0.38 |
| | 0.3 | 2.52±0.01 | 5.38±0.04 | 9.70±0.25 | 14.86±0.38 | 21.73±0.39 | 29.06±0.85 |
| | 0.6 | 2.03±0.08 | 4.72±0.51 | 9.07±0.48 | 13.90±1.21 | 21.67±2.74 | 29.77±4.87 |
| Linalol | 0.1 | 2.06±0.04 | 5.61±0.04 | 10.80±0.04 | 16.31±0.04 | 22.79±0.11 | 30.37±1.90 |
| | 0.3 | 2.09±0.29 | 5.47±0.33 | 10.31±0.45 | 16.54±1.89 | 23.65±3.07 | 31.98±1.86 |
| | 0.6 | 2.04±0.03 | 5.27±0.14 | 9.88±0.33 | 15.05±0.46 | 21.64±0.33 | 28.63±0.50 |
| Limoneno | 0.1 | 1.97±0.04 | 5.35±0.03 | 10.31±0.05 | 15.63±0.06 | 21.97±1.43 | 29.18±0.09 |
| | 0.3 | 2.16±0.02 | 5.59±0.01 | 10.48±0.00 | 15.86±0.06 | 22.36±0.01 | 30.68±2.00 |
| | 0.6 | 1.95±0.02 | 4.60±0.03 | 8.70±0.27 | 13.50±0.63 | 20.10±0.82 | 28.98±3.09 |
| Terpineno | 0.1 | 2.02±0.06 | 5.39±0.18 | 10.19±0.31 | 15.37±0.51 | 21.41±0.07 | 28.71±2.30 |
| | 0.3 | 2.04±0.12 | 5.22±0.11 | 9.73±0.04 | 14.60±0.03 | 21.04±0.31 | 28.92±1.67 |
| | 0.6 | 2.24±0.19 | 4.90±0.28 | 8.87±0.43 | 13.48±0.69 | 20.64±0.87 | 29.80±3.12 |
| Alfalfa | 0 | 2.19±0.04 | 4.96±0.41 | 8.86±0.96 | 13.53±0.92 | 22.12±1.13 | 32.30±5.41 |

* MS: matéria seca. DP: Desvio padrão.

Tabela 3. Produção total de gases (mL g⁻¹ MS), ácidos graxos voláteis (mM/L) e metanóide *in vitro* nos diferentes óleos essenciais e terpenóides utilizados

| Amostra | Dosis (mL) | Producción total de Gas (mL g ⁻¹ MS) ± *DE | Ácidos Graxos Volátiles (mM/L) ± *DP | | | Metano mM/L |
|-----------------------------------|------------|---|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | Ácido acético | Ácido Propiónico | Ácido butírico | |
| Óleo essencial de alecrim | 0.1 | 144.94±1.44 ^a | 2380.5±0.02 ^a | 782.20±0.15 ^a | 43.62±0.19 ^b | 873.57±0.06 ^{bc} |
| | 0.3 | 146.98±5.55 ^a | 2154.3±0.03 ^a | 664.61±0.16 ^a | 32.88±0.19 ^b | 799.85±0.07 ^{bc} |
| | 0.6 | 139.13±3.73 ^a | 1892.2±0.04 ^a | 526.14±0.16 ^a | 24.99±0.19 ^b | 716.83±0.07 ^{bc} |
| Óleo essencial de cravo | 0.1 | 35.76±6.15 ^c | 435.87±0.13 ^b | 39.15±0.19 ^b | 0.00±0.00 ^c | 185.37±0.01 ^a |
| | 0.3 | 22.48±9.39 ^c | 312.6±0.13 ^b | 40.46±0.19 ^b | 0.00±0.00 ^c | 129.54±0.01 ^a |
| | 0.6 | 20.72±1.24 ^{cd} | 322.25±0.13 ^b | 40.85±0.19 ^b | 15.16±0.19 ^{bc} | 139.85±0.12 ^a |
| Óleo essencial de eucalipto | 0.1 | 157.59±3.62 ^a | 2343.2±0.02 ^a | 0.00±0.00 ^c | 617.94±0.10 ^a | 1301.62±0.07 ^c |
| | 0.3 | 176.86±1.10 ^a | 2291.8±0.02 ^a | 676.56±0.16 ^a | 37.97±0.19 ^b | 860.46±0.06 ^{bc} |
| | 0.6 | 175.30±3.62 ^a | 2514.2±0.01 ^a | 764.87±0.43 ^a | 46.61±0.19 ^b | 939.72±0.06 ^{bc} |
| Óleo essencial de hortelã-pimenta | 0.1 | 65.29±4.49 ^b | 244.9±11.77 ^b | 51.76±25.88 ^a | 18.39±3.82 ^{bc} | 103.32±33.26 ^a |
| | 0.3 | 26.26±7.60 ^c | 868.6±12.01 ^{ab} | 51.00±25.69 ^a | 106.3±44.19 ^{ab} | 419.42±33.55 ^b |
| | 0.6 | 16.80±6.69 ^d | 234.92±4.36 ^b | 52.84±0.19 ^b | 21.46±0.19 ^b | 99.77±2.74 ^a |
| Óleo essencial de orégano | 0.1 | 30.66±0.82 ^c | 121.7±0.14 ^b | 0.00±0.00 ^c | 10.32±0.19 ^{bc} | 58.89±0.20 ^a |
| | 0.3 | 31.82±1.96 ^c | 117.0±0.15 ^b | 21.72±0.19 ^b | 17.95±0.19 ^{bc} | 53.88±0.13 ^a |
| | 0.6 | 29.05±4.68 ^c | 105.6±0.15 ^b | 25.85±0.19 ^b | 17.56±0.19 ^{bc} | 47.48±0.13 ^a |
| Óleo essencial de canela | 0.1 | 37.88±9.66 ^{bc} | 473.2±0.12 ^b | 108.35±0.19 ^{ab} | 0.00±0.00 ^c | 183.15±0.01 ^a |
| | 0.3 | 32.39±3.88 ^c | 249.48±0.14 ^b | 47.47±0.19 ^b | 0.00±0.00 ^c | 99.21±0.01 ^a |
| | 0.6 | 35.66±2.31 ^c | 323.43±0.13 ^b | 72.03±0.19 ^b | 39.63±0.19 ^b | 141.59±0.12 ^a |
| Timol | 0.1 | 47.99±4.92 ^{bc} | 1884.20±0.04 ^a | 720.35±0.15 ^a | 39.87±0.19 ^b | 665.74±0.08 ^b |
| | 0.3 | 45.83±3.55 ^{bc} | 1874.53±0.24 ^a | 0.00±0.00 ^c | 551.46±0.11 ^a | 1064.12±0.21 ^c |
| | 0.6 | 48.24±3.41 ^{bc} | 1824.96±0.05 ^a | 696.55±0.15 ^a | 34.59±0.19 ^b | 643.52±0.08 ^b |
| Carvacrol | 0.1 | 28.47±0.38 ^c | 1933.54±0.23 ^a | 0.00±0.00 ^c | 603.55±0.10 ^a | 1111.51±0.20 ^c |
| | 0.3 | 29.06±0.85 ^c | 1826.95±0.05 ^a | 724.29±0.15 ^a | 35.87±0.19 ^b | 637.30±0.08 ^b |
| | 0.6 | 29.77±4.87 ^c | 1436.98±0.01 ^a | 0.00±0.00 ^c | 438.03±0.13 ^a | 821.85±0.08 ^{bc} |
| Linalol | 0.1 | 30.37±1.90 ^c | 1868.50±0.05 ^a | 731.91±0.15 ^a | 38.56±0.19 ^b | 654.98±0.08 ^b |
| | 0.3 | 31.98±1.86 ^c | 1891.33±0.04 ^a | 0.00±0.00 ^c | 582.39±0.11 ^a | 1084.05±0.09 ^c |
| | 0.6 | 28.63±0.50 ^c | 1908.58±0.04 ^a | 713.00±0.15 ^a | 33.15±0.19 ^b | 676.05±0.08 ^b |
| Limoneno | 0.1 | 29.18±0.09 ^c | 1990.96±0.02 ^a | 0.00±0.00 ^c | 603.49±0.10 ^a | 1137.33±0.07 ^c |
| | 0.3 | 30.68±2.00 ^c | 1909.62±0.04 ^a | 0.00±0.00 ^c | 567.93±0.11 ^a | 1086.50±0.09 ^c |
| | 0.6 | 28.98±3.09 ^c | 1755.33±0.05 ^a | 625.03±0.34 ^a | 35.26±0.19 ^b | 632.12±0.27 ^b |
| Terpineno | 0.1 | 28.71±2.30 ^c | 0.00±0.00 ^c | 0.00±0.00 ^a | 684.93±0.09 ^a | 273.97±0.05 ^{ab} |
| | 0.3 | 28.92±1.67 ^c | 1990.91±0.04 ^a | 762.28±0.15 ^a | 40.87±0.19 ^b | 702.63±0.07 ^{bc} |
| | 0.6 | 29.80±3.12 ^c | 1886.46±0.27 ^a | 0.00±0.00 ^c | 583.48±0.10 ^a | 1082.30±0.23 ^c |
| Alfalfa | 0 | 32.30±5.41 ^c | 1673.52±0.06 ^a | 775.33±0.15 ^a | 43.50±0.19 ^b | 557.27±0.08 ^b |

* DP: Desvio padrão, valores médios com letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente (p <0,05).

CONCLUSÕES

A mitigação do metano foi observada com óleo de alecrim em sua dose máxima na fermentação ruminal *in vitro*; por apresentar concentrações aumentadas de AGV's (acético, propiônico e butírico). Os compostos terpenóides com melhor fermentação ruminal *in vitro* foram timol, linalol e limoneno na dose máxima. Sugere-se aprofundar o uso de óleos essenciais de plantas, pois podem ser uma alternativa na busca por produtos orgânicos com maior sustentabilidade.

LITERATURA CITADA

ALBADO PE, Sáez FG, S. Grabiél AS. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*. 12(1):16-19. ISSN: 1729-214X. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3.pdf>

BAKKALI F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2):446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>

BAÑUELOS VR, Delgadillo RL, Echavarría CF, Delgadillo RO, Meza LC. 2018. Composición química y FTIR de extractos etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Agrociencia*. 52(3): 309-321. ISSN 2521-9766. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v52n3/2521-9766-agro-52-03-309.pdf>

BEJAOUI A, Boulila A, Boussaid M. 2013. Chemical composition and biological activities of essential oils and solvent extracts of *Origanum vulgare* subsp. *Glandulosum* Desf. From Tunisia. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7 (32): 2429-2435. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.902>

BROWN K, Uwiera RRE, Kalmokoff ML, Brooks SPJ, Inglis GD. 2017. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *International Journal Antimicrobiology Agents*. 49(1):12–24. <https://doi.org/10.1016 / j.ijantimicag.2016.08.006>

CHOUHAN S, Sharma K, Guleria S. 2017. Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*. 4(3):58. <https://doi.org/10.3390/medicines4030058>

CONDO C, Anacarso I, Sabia C, Iseppi R, Anfelli I, Forti L, Niederhäusern S, Bondi M, Messi P. 2018. Antimicrobial activity of spice essential oils and their effectiveness in mature biofilms of human pathogens. *Natural Product Research*. 34(4):567-574. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1490904>

CRUZ MC, Diaz-Gómez M, Sook-Oh M. 2017. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: A review. *Pharmaceutical Biology*. 55(1): 1992-1998. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1347188>

CYTEL SOFTWARE. 2010. Statxact 9 with Cytel studio. Statistical software for exact nonparametric inference. *User manual*. Cytel Software, New York, USA. Pp. 1345.

DHAKAD AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM. 2017. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 98(3):833-848. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8600>

ESTÉVEZ RRM, Cutuli SMT. 2011. Alternativas en promoción del crecimiento tras la prohibición de los antibióticos I: Modificadores metabólicos y modificadores inmunológicos. *Información Veterinaria, Revista de la Organización Colegial Veterinaria Española*. 04:18-23. ISSN 1130-5436. http://www.colvet.es/sites/default/files/2015-12/2011_04_informacion_veterinariaabril_2011.pdf

FIRMINO D, Cavalcante T, Gomes GA, Firmino N, Rosa L, Carvalho M, Catunda F. 2018. Antibacterial and Antibiofilm Activities of Cinnamomum Sp. Essential Oil and Cinnamaldehyde: Antimicrobial Activities. *Scientific World Journal*. 2018:1-9. <https://doi.org/10.1155 / 2018/7405736>

FRIEDMAN M. 2014. Chemistry and Multibeneficial Bioactivities of Carvacrol (4-Isopropyl-2-methylphenol), a Component of Essential Oils Produced by Aromatic Plants and Spices: Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62, 7652–7670. <https://doi.org/10.1021/jf5023862j>

GALLEGOS-FLORES PI, Bañuelos-Valenzuela R, Delgadillo-Ruiz L, Meza-López C, Echavarría-Cháirez F. 2019. Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 22(2):241-248. ISSN: 1870-0462. <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/2838>

GARCÍA-GARCÍA R, López-Malo A, Palou E. 2011. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. *Journal of Food Science*. 76(2):M95-M100. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.02005.x>

KIM E, Guan L, Lee SJ, Lee SM, Lee SS, Lee ID, Lee SK, Lee SS. 2015. Effects of Flavonoid-rich Plant Extracts on In vitro Ruminant Methanogenesis, Microbial Populations and Fermentation Characteristics. Asian-Australasian. *Journal of Animal Sciences*. 28(4):530-537. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0692>

KURNIAWATI A, Yusiati LM, Widodo W, Artama WT. 2020. Study of Local Herb Potency as Rumen Modifier: Red Ginger (*Zingiber officinale* Var. Rubrum) Addition Effect on In Vitro Ruminant Nutrient Digestibility. *Animal Production*. 21(1):30-37. <https://doi.org/10.20884/1.jap.2019.21.1.713>

MOSS AR, Jouany JP, Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Annales de zootechnie*. 49(3):231-253. <https://doi.org/10.1051/animres:2000119>

NILE SH, Nile AS, Keum YS. 2017. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. *3 Biotech*. 7(1):76. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0706-9>

RODRÍGUEZ-GARCÍA I, Silva-Espinoza B, Ortega-Ramírez L, Leyva J, Siddiqui Md, Cruz-Valenzuela M, González-Aguilar G, Ayala-Zavala J. 2015. Oregano Essential Oil as an Antimicrobial and Antioxidant Additive in Food Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56(10):1717-1727. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.800832>

SEJIAN V, Bhatta R, Soren NM, Malik PK, Ravindra JP, Prasad CS, Lal R. 2015. Introduction to Concepts of Climate Change Impact on Livestock and Its Adaptation and Mitigation. En: Sejian V, Gaughan J, Baumgard L, Prasad C. (eds) *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*. Springer, New Delhi. Pp. 1-25. ISBN: 978-81-322-2265-1. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1_1

SORENTINO S, Landmesser U. 2005. Nonlipid-lowering effects of statins. *Current Treatment Options Cardiovascular Medicine*. 7(6):459-66. <https://doi.org/10.1007/s11936-005-0031-1>

TEIXEIRA B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng N. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 93:2707-2714. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>

THEODOROU MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*. 48: 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)

UGBOGU EA, Elghandour MM, Ikpeazu VO, Buendía GR, Molina OM, Arunsi UO, Salem AZ. 2019. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. *Journal of Cleaner Production*. 213:915-925. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.12.233>

WANG J, Liu M, Wu Y, Wang L, Liu J, Jiang L, Yu Z. 2016. Medicinal herbs as a potential strategy to decrease methane production by rumen microbiota: a systematic evaluation with a focus on *Perilla frutescens* seed extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(22):9757-9771. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7830-z>

YUAN H, Ma Q, Ye L. y Piao G. 2016. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*. 21(5):559. <https://doi.org/10.3390/moléculas21050559>