



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ELIAS RODRIGUES CAVALHEIRO JUNIOR

**EFEITOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ALHO E ALECRIM
SOBRE O MICROBIOMA RUMINAL, METABOLOMA,
DESEMPENHO PRODUTIVO E QUALIDADE DE CARCAÇA
E CARNE DE OVINOS CONFINADOS**

Londrina
2025

ELIAS RODRIGUES CAVALHEIRO JUNIOR

Efeitos dos óleos essenciais de alho e alecrim sobre o microbioma ruminal, metaboloma, desempenho produtivo e qualidade de carcaça e carne de ovinos confinados

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Odimári Pricila Prado Calixto

Londrina
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cavalheiro Junior, Elias Rodrigues .

Efeitos dos óleos essenciais de alho e alecrim sobre o microbioma ruminal, metaboloma, desempenho produtivo e qualidade de carcaça e carne de ovinos confinados / Elias Rodrigues Cavalheiro Junior. - Londrina, 2025. 102 f.

Orientador: Odímári Pricila Prado Calixto.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2025.

Inclui bibliografia.

1. Nutrição de Ruminantes - Tese. 2. Metabolômica - Tese. 3. Aditivos Naturais - Tese. 4. Genômica - Tese. I. Pricila Prado Calixto, Odímári . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636

ELIAS RODRIGUES CAVALHEIRO JUNIOR

Efeitos dos óleos essenciais de alho e alecrim sobre o microbioma ruminal, metaboloma, desempenho produtivo e qualidade de carcaça e carne de ovinos confinados

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Orientadora Dr.^a Odimári Pricila Prado
Calixto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Rodolpho Martin do Prado
Université Laval – ULAVAL / CA

Londrina, 16 de Maio de 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida, a saúde necessária para enfrentar cada desafio, e por nunca me deixar sozinho nos momentos de dúvida e silêncio. Sua presença foi meu sustento em cada etapa desta caminhada.

À minha família, minha base e porto seguro. À minha mãe, Flora Lopes de Oliveira Cavaleiro, e ao meu pai, Elias Rodrigues Cavaleiro, pelo amor incondicional e por sempre acreditarem no meu potencial. Aos meus irmãos, Jhonata Ariel de Oliveira Cavaleiro e Diego Oliveira Cavaleiro, à minha cunhada, Patrícia Dias Cavaleiro, e à minha pequena e amada sobrinha, Luisa Dias Cavaleiro, por todo companheirismo, apoio e amor constante.

À Professora Dra. Odimári Pricila Prado Calixto, minha orientadora, minha mentora e inspiração. Obrigado pelos ensinamentos, pela paciência, pelo apoio e, principalmente, por acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu duvidava das minhas próprias capacidades. Obrigado por me ajudar a me tornar o profissional que sou hoje e por todo trabalho construído juntos ao longo desses quase sete anos, entre o mestrado e o doutorado.

Ao Professor Dr. Rodolpho Martin do Prado, por ter aceitado me orientar durante uma das experiências mais incríveis da minha vida, o intercâmbio no Canadá e por continuar acreditando em mim e apoiando os próximos passos que virão no pós-doutorado.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, companheiros de jornada científica e pessoal: Wellington Caetano, Camila Serafim e Erica Franconere. Obrigado por estarem ao meu lado em todas as etapas experimentais, nos trabalhos de bancada, nos planejamentos, e, principalmente, nos momentos de descontração e amizade que tornaram tudo mais leve.

Agradeço também aos alunos de graduação Kawane, Gabriel, Raissa, Paola, Alexia, Natascha e Lara por toda a ajuda durante o experimento e no laboratório. Sem a colaboração de vocês, nada disso teria sido fácil — o comprometimento e a disposição para trabalhar foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Eduardo Pilau e ao seu orientando Renan Venci, pelo apoio, pela

parceria e pela generosidade com seu tempo e conhecimento, fundamentais para a realização das análises metabolômicas deste trabalho.

À banca examinadora, que gentilmente aceitou o convite para avaliar esta tese, meu profundo agradecimento. A contribuição de cada um de vocês é essencial para o aprimoramento deste trabalho, trazendo reflexões valiosas e engrandecendo o processo acadêmico.

Aos amigos que me acompanham desde a graduação e me apoiaram incondicionalmente ao longo dessa trajetória: Guilherme Agostinis, Daniela Kaizer, Gabriela Nagi. E aos que somaram forças e carinho em tantos momentos: Raissa Escobar (Sol), Camila Rogel, Nínive Corletto, Mariellen Andrade, Rafaela Magalhães, Nozor, Renan Almeida, Giovanna Sagae, Larissa Arcoleze. A todos os demais que, direta ou indiretamente, deixaram sua marca nessa caminhada, meu sincero e profundo obrigado.

RESUMO

CAVALHEIRO JUNIOR, Elias Rodrigues. **Efeitos dos óleos essenciais de alho e alecrim sobre o microbioma ruminal, metaboloma, desempenho produtivo e qualidade de carcaça e carne de ovinos confinados**. 2025. 105 F. Tese De Doutorado Em Ciência Animal – Centro De Ciências Agrárias, Universidade Estadual De Londrina, Londrina, 2025.

Este trabalho foi elaborado com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação com óleos essenciais (OEs) de alho e alecrim sobre o desempenho produtivo, características de carcaça, qualidade da carne, metaboloma ruminal e diversidade microbiana do rúmen de cordeiros confinados. O experimento foi conduzido com 35 cordeiros machos, não castrados, cruzados Texel × Dorper × Santa Inês, com peso inicial médio de $26,3 \pm 6,2$ kg, distribuídos em cinco tratamentos dietéticos: sem aditivo, alho (0,14 e 1,00 mL/L de líquido ruminal) e alecrim (0,40 e 1,00 mL/L de líquido ruminal). As dietas foram formuladas com base em 30% de silagem de milho e 70% de concentrado composto por milho moído e farelo de soja, sendo fornecidas ad libitum por 90 dias. Os dados resultaram em três artigos científicos. O primeiro avaliou o desempenho zootécnico, características de carcaça e qualidade da carne. A dieta com 0,40 mL/L de óleo essencial de alecrim (Alecrim B) proporcionou os maiores ganhos médios diários entre os dias 31–60 (0,233 kg/dia) e 61–90 (0,193 kg/dia), maior consumo de matéria seca, melhor conversão alimentar, maior peso final (45,16 kg) e espessura de gordura subcutânea (4,68 mm), sem alterações nos parâmetros de cor, pH ou oxidação lipídica da carne. Os tratamentos com óleo de alho não apresentaram diferença entre as dosagens. O segundo artigo avaliou a composição da microbiota ruminal por meio do sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA. A menor dosagem de óleo de alecrim (0,40 mL/L) induziu alterações significativas na estrutura microbiana do rúmen, promovendo uma redução na abundância relativa de gêneros associados à produção excessiva de amônia e fermentações menos eficientes, como *Prevotella*, e favorecendo o crescimento de bactérias celulolíticas e lipolíticas como *Ruminococcus* e *Butyrivibrio*. Além disso, observou-se aumento da diversidade em nível de gênero e maior uniformidade entre os indivíduos do grupo Alecrim B, sugerindo uma microbiota mais estável e funcionalmente eficiente para a degradação de fibras e metabolismo energético. O terceiro artigo investigou o metaboloma do líquido ruminal por UHPLC-MS/MS em abordagem não direcionada, utilizando extrações com acetato de etila e éter metil-terc-butílico. Foram detectadas 7.064 entidades químicas e identificados 47 metabólitos. A dieta Alecrim B apresentou um metaboloma distinto, com destaque para compostos como ácido sebácico, aurantiamida e colesteno, sugerindo estímulo de rotas metabólicas associadas à digestão e ao aproveitamento de nutrientes. A integração dos dados zootécnicos, análise genética e metabolômica da microbiota ruminal demonstra que o óleo essencial de alecrim na dosagem de 0,40 mL/L melhora o desempenho produtivo e modula o ambiente ruminal de forma a favorecer processos fermentativos mais eficientes em cordeiros confinados, caracterizando-se como um aditivo funcional promissor para sistemas intensivos de produção.

Palavras-chave: Aditivos naturais; Acetato de etila; Ganho médio diário; Líquido ruminal; Matyash; Qualidade de carne.

ABSTRACT

CAVALHEIRO JUNIOR, Elias Rodrigues. **Effects of Garlic and Rosemary Essential Oils on the Ruminal Microbiome, Metabolome, Productive Performance, and Carcass and Meat Quality of Confined Sheep**. 2025. 105. Tese de doutorado em Ciência Animal – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

This study was designed to evaluate the effects of supplementation with essential oils (EOs) of garlic and rosemary on the productive performance, carcass traits, meat quality, ruminal metabolome, and microbial diversity of the rumen in confined lambs. The experiment was conducted with 35 non-castrated male lambs, Texel × Dorper × Santa Inês crossbreeds, with an average initial body weight of 26.3 ± 6.2 kg, distributed across five dietary treatments: no additive, garlic (0.14 and 1.00 mL/L of ruminal fluid), and rosemary (0.40 and 1.00 mL/L of ruminal fluid). Diets were formulated based on 30% corn silage and 70% concentrate composed of ground corn and soybean meal, and were offered ad libitum for 90 days. The data resulted in three scientific articles. The first evaluated zootechnical performance, carcass traits, and meat quality. The diet containing 0.40 mL/L of rosemary essential oil (Rosemary B) promoted the highest average daily gains between days 31–60 (0.233 kg/day) and 61–90 (0.193 kg/day), greater dry matter intake, improved feed conversion, higher final body weight (45.16 kg), and subcutaneous fat thickness (4.68 mm), with no changes in meat color, pH, or lipid oxidation parameters. The garlic oil treatments showed no differences between the dosages. The second article assessed rumen microbiota composition through sequencing of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene. The lower dose of rosemary oil (0.40 mL/L) induced significant shifts in rumen microbial structure, promoting a reduction in the relative abundance of genera associated with excessive ammonia production and less efficient fermentations, such as *Prevotella*, while favoring the growth of cellulolytic and lipolytic bacteria such as *Ruminococcus* and *Butyrivibrio*. Furthermore, greater genus-level diversity and higher uniformity among individuals in the Rosemary B group were observed, suggesting a more stable and functionally efficient microbiota for fiber degradation and energy metabolism. The third article investigated the ruminal fluid metabolome using untargeted UHPLC-MS/MS analysis, employing ethyl acetate and methyl tert-butyl ether extractions. A total of 7,064 chemical entities were detected, with 47 metabolites identified. The Rosemary B diet yielded a distinct metabolomic profile, with notable compounds such as sebacic acid, aurantiamide, and cholestenone, suggesting the stimulation of metabolic pathways related to digestion and nutrient utilization. The integration of zootechnical data with genetic and metabolomic analyses of the rumen microbiota demonstrates that rosemary essential oil at a dose of 0.40 mL/L enhances productive performance and modulates the ruminal environment in a way that favors more efficient fermentative processes in confined lambs, positioning it as a promising functional additive for intensive production systems.

Key-words: Dry matter intake; Ethyl acetate; Feed additives; Meat quality; Matyash; Ruminal fluid.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 2

- Figura 1** – Distribuição relativa das principais ordens bacterianas da microbiota ruminal de cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim.59
- Figura 2** – Distribuição relativa dos principais gêneros bacterianos da microbiota ruminal de cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim61

Artigo 3

- Figura 1** – Rede molecular (MN) gerada usando características moleculares do líquido ruminal de ovinos alimentados com diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim, extraídas por meio de acetato de etila e éter metil-terc-butílico, em modo positivo.....75
- Figura 2** – Rede molecular (MN) gerada usando características moleculares do líquido ruminal de ovinos alimentados com diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim, extraídas por meio de acetato de etila e éter metil-terc-butílico, em modo negativo76
- Figura 3** – Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas do líquido ruminal de ovinos, alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim, extraído em acetato de etila, modo negativo (A) e positivo (B). Alho B = 0,14 ml por litro de líquido ruminal; Alho A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim B = 0,40 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal e sem aditivo = sem adição de óleo essencial.77
- Figura 4** –Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas do líquido ruminal de ovinos, alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim, extração éter metil-terc-butílico, modo negativo (A) e positivo (B). Alho B = 0,14 ml por litro de líquido ruminal; Alho A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim B = 0,40 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal e sem aditivo = sem adição de óleo essencial78
- Figura 5**– Análise de Componentes Principais das amostras extraídas com acetato de etila, sem aditivo = sem adição de óleos essenciais; Alho A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alho B = 0,14 mL por litro de líquido ruminal,

Alecrim A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim B = 0,40 mL por litro de líquido ruminal.84

Figura 6— Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras extraídas com éter metil-terc-butílico, sem aditivo = sem adição de óleos essenciais; Alho A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alho B = 0,14 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim B = 0,40 mL por litro de líquido ruminal.85

Figura 7— Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas do líquido ruminal de ovinos, alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim, extraídas com acetato de etila e com éter metil-terc-butílico..86

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Tabela 1** – Composição química dos alimentos, proporção dos ingredientes na dieta e composição química da dieta base utilizados na ração fornecida para cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alecrim ou alho.38
- Tabela 2** – Desempenho e eficiência alimentar de cordeiros confinados e alimentados com rações contendo diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim.41
- Tabela 3** – Características de carcaça de confinados, alimentados com rações contendo diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim. ...44
- Tabela 4** – Parâmetros do músculo *Longissimus lumborum* de alimentados com rações contendo diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim.... 46

Artigo 2

- Tabela 1** – Composição química dos alimentos, proporção dos ingredientes na dieta e composição química da dieta base utilizados na ração fornecida para cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alecrim ou alho. 59
- Tabela 2** –Número de espécies bacterianas observadas, estimativa de riqueza de Chao, e índices de diversidade de Shannon e Simpson (média ± erro padrão) da microbiota ruminal de cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim61

Artigo 3

- Tabela 1** – Identificação dos metabólitos do líquido ruminal de ovinos alimentados com diferentes dosagens de óleos essenciais de alho e alecrim e analisado por UHPLC-MS/MS. Número e identificação do composto, fórmula molecular, massa monoisotópica teórica, m/z do íon observado, erro de massa, identificação da dieta e forma de extração.79
- Tabela 2** – Porcentagem em relação ao total de metabólitos putativos identificados a partir da extração por acetato de etila e éter metil-terc-butilico, analisado por UHPLC-MS/MS.....83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta

BHBA – Beta-hidroxibutirato

CA – Conversão alimentar

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CM – Comprimento do músculo

CV – Coeficiente de variação

DFI-MS/MS – Espectrometria de massas em tandem com infusão direta

EE – Extrato etéreo

EG – Espessura de gordura

FAZESC – Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina

FDA – Fibra em detergente ácido

FDN – Fibra em detergente neutro

GMD – Ganho médio diário

HEM – Hemicelulose

ICP-MS – Espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente

MN – Matéria natural

MO – Matéria orgânica

MS – Matéria seca

NFC – Carboidratos não fibrosos

NMR – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

OEs – Óleos essenciais

PCA – Análise de componentes principais

PCF – Peso da carcaça fria

PCQ – Peso da carcaça quente

PM – Peso do músculo

PMP – Peso médio da partícula

PPR – Perda de peso no resfriamento

PTSO – Tiosulfonato de propil-propano

RCF – Rendimento da carcaça fria

RCQ – Rendimento da carcaça quente

SOD – Superóxido dismutase

UHPLC-QTOF-MS/MS – Cromatografia líquida de ultra alta eficiência acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo

Sumário

1	Introdução	14
2	Revisão de literatura	17
2.1	Ovinocultura brasileira	17
2.2	Aditivos para ruminantes	18
2.3	Óleos essenciais.....	19
2.3.1	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.).....	21
2.3.2	Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	23
2.4	Microbiota ruminal	24
2.5	metabolômica	25
3	Referências	28
4	Hipótese	32
5	Objetivo	33
5.1	Objetivo geral	33
5.2	Objetivos específicos.....	33
6	Artigo 1- Óleos essenciais de alho (<i>Allium sativum</i> L.) e alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.) no desempenho produtivo e qualidade de carcaças de cordeiros confinados.....	34
	Introdução.....	35
	Material e métodos	36
	Resultados e discussão	41
	Conclusão.....	47
	Referências	48
7	Artigo 2 - Óleos essenciais de alho (<i>allium sativum</i> L.)e alecrim (<i>rosmarinus officinalis</i> L.) na diversidade microbiota ruminal de cordeiros confinados	51
	Introdução.....	52
	Material e métodos	53
	Resultados e discussão	56
	Conclusão.....	63
	Referências	64
	Anexos.....	66
8	Artigo 3 - Metabolômica não-direcionada e metabolismo ruminal de ovinos: efeitos dos óleos essenciais de alho e alecrim.....	67
	Introdução.....	68
	Material e Métodos	69
	Resultados e Discussão	73
	Conclusão.....	87
	Referências	89
	Anexos.....	91

1 1 INTRODUÇÃO

2 A ovinocultura desempenha um papel relevante na pecuária do Sul do Brasil,
3 contribuindo significativamente para a renda de pequenos produtores rurais. No
4 Estado do Paraná, por exemplo, a atividade tem sido integrada à produção de grãos
5 e à bovinocultura, aumentando a renda dos agricultores familiares (Debortoli et al.,
6 2021). Dentre as diversas etapas do sistema de produção de carne ovina, a fase de
7 terminação tem sido amplamente discutida devido à sua influência na qualidade final
8 do produto (Bettencourt et al., 2020).

9 Uma estratégia para intensificar a produção e reduzir o tempo de terminação dos
10 cordeiros é o aumento da inclusão de concentrado na dieta. No entanto, essa prática
11 pode levar a distúrbios digestivos devido ao maior consumo de carboidratos
12 fermentáveis. Para minimizar esses efeitos adversos, aditivos como os ionóforos são
13 frequentemente utilizados. Contudo, o uso de antibióticos e outros aditivos sintéticos
14 como promotores de crescimento foi proibido na União Europeia desde 2006,
15 conforme o regulamento 1831/2003/EC (COMISSÃO EUROPEIA, 2003).

16 Diante desse contexto, a busca por alternativas naturais aos antibióticos tem
17 crescido significativamente, impulsionada por preocupações com a resistência
18 antimicrobiana e pela demanda por sistemas de produção mais sustentáveis
19 (Pangesti; Jayanegara; Laconi, 2024). Entre essas alternativas, os óleos essenciais
20 têm se destacado, pois, assim como os aditivos sintéticos, podem melhorar a
21 qualidade e a digestibilidade dos alimentos sem comprometer a saúde animal e a
22 segurança do consumidor. Dentre os óleos essenciais com potencial para modular a
23 fermentação ruminal, destacam-se o de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e o de alho
24 (*Allium sativum* L.).

25 O alecrim, uma planta perene pertencente à família *Lamiaceae*, é amplamente
26 utilizado como especiaria e na medicina tradicional devido às suas reconhecidas
27 propriedades antibacterianas. Seu óleo essencial contém uma complexa mistura de
28 monoterpenoides, como α -pineno, β -pineno, canfeno, 1,8-cineol, cânfora, borneol,
29 acetato de bornilo e verbenona, que tem expressiva atividade antimicrobiana frente a
30 microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Silva; Monteiro, 2021). Estudos
31 recentes demonstram que o alecrim apresenta amplo espectro de ação

antimicrobiana, sendo eficaz na inibição de microrganismos, efeito atribuído principalmente à presença de cineol e ácido rosmarínico em sua composição (Goes et al., 2020).

O óleo essencial de alho é rico em compostos sulfurados, com destaque para a alicina, dissulfeto de dialila, trissulfeto de dialila, tetrassulfeto de dialila, mercaptano de alila e metil-alil-trissulfeto. Esses metabólitos apresentam propriedades bioativas amplamente reconhecidas, notadamente por sua ação antimicrobiana seletiva, além de efeitos antioxidantes e imunomoduladores. Tais efeitos estão associados à ativação de vias celulares de defesa contra o estresse oxidativo, como a via Nrf2/HO-1 (Saidu et al., 2013). Estudos demonstram que os compostos polissulfetados de dialila exercem atividade biológica relevante em extratos sulfurados de alho (Saidu et al., 2013), sendo que análises *in silico* reforçam o potencial farmacológico desses compostos, inclusive quando derivados de espécies vegetais análogas (Mochiutti et al., 2019).

Um estudo conduzido por Cavalheiro Junior et al., (2021) investigou os efeitos da inclusão de óleos essenciais de alecrim e alho sobre a cinética de degradação de carboidratos em dietas com diferentes relações volumoso:concentrado para cordeiros confinados. O óleo essencial de alecrim promoveu alterações significativas em parâmetros como tempo de colonização microbiana, taxa de degradação e volume final de gases. Foi observada uma redução linear na produção de gases totais com o aumento da dose, além de efeitos quadráticos nos parâmetros fermentativos. O volume de gases oriundos da degradação de carboidratos não fibrosos (Vnfc) atingiu o valor máximo de 173,44 mL g⁻¹ MS na dose de 0,71 g L⁻¹, enquanto a menor taxa de degradação (Kdnfc) foi observada em 0,89 g L⁻¹. Para os carboidratos fibrosos, o menor volume de gases (Vfc) foi registrado em 1,17 g L⁻¹, e a menor taxa de degradação (Kdfc) em 1,07 g L⁻¹, com maior tempo de colonização microbiana (L) em 1,18 g L⁻¹. O óleo essencial de alho também apresentou efeito quadrático sobre o volume de gases, com o menor valor observado entre as doses de 1,35 e 1,54 g L⁻¹, indicando seletividade na ação antimicrobiana. Com base nesses achados, os autores recomendaram a inclusão de 1,0 g L⁻¹ de ambos os óleos como estratégia eficiente para modular a fermentação ruminal em dietas com alta proporção de concentrado, mantendo a eficiência digestiva e controlando a produção de gases.

64 Diante dessa problemática, o presente estudo tem como objetivo avaliar o uso
65 de óleos essenciais de alecrim e alho como aditivos alimentares na fermentação e
66 microbiota ruminal por meio do estudo de desempenho de cordeiros, com ênfase em
67 análises genética e metabolômica de bactérias ruminais.

68 2 REVISÃO DE LITERATURA

69 2.1 OVINOCULTURA BRASILEIRA

70 A ovinocultura representa uma atividade relevante dentro da pecuária brasileira,
71 especialmente como fonte de renda e subsistência para pequenos e médios
72 produtores, notadamente em sistemas de produção familiar. A atividade se apresenta
73 como uma alternativa econômica viável, com potencial de integração à bovinocultura
74 de corte e leite, sobretudo em regiões que buscam diversificação produtiva e melhor
75 aproveitamento dos recursos agropecuários disponíveis (Debortoli et al., 2021;
76 Monteiro; Brisola; Filho, 2021). O crescimento da ovinocultura tem sido impulsionado
77 por fatores como o melhoramento genético, o menor ciclo produtivo, e o custo de
78 manutenção reduzido em comparação com outras espécies, sendo relatado que a
79 manutenção de dez ovelhas pode representar custo inferior ao de um único bovino
80 (Santos De Aquino et al., 2016).

81 Atualmente, o rebanho ovino brasileiro é estimado em aproximadamente 21,39
82 milhões de cabeças, com forte concentração no Nordeste, que abriga 72,57% do
83 efetivo nacional. Em seguida, destacam-se o Sul com 19,75%, o Sudeste com 2,61%,
84 o Norte com 2,39% e o Centro-Oeste com 2,14% (IBGE, 2023). Na região Sul,
85 principal produtora fora do semiárido nordestino, os rebanhos são compostos,
86 principalmente, por 3,36 milhões de cabeças no Rio Grande do Sul, 515,8 mil no
87 Paraná e 347,6 mil em Santa Catarina. No entanto, apesar da relevância regional e
88 nacional da ovinocultura, a cadeia produtiva ainda enfrenta desafios estruturais, como
89 a informalidade na comercialização, baixa assistência técnica, predominância de
90 abates clandestinos e falta de incentivos governamentais, que comprometem a
91 competitividade e a agregação de valor à carne ovina (Pereira Neres et al., 2024).

92 Nesse cenário, com a intensificação dos sistemas de produção e a necessidade
93 de melhorar a eficiência zootécnica e econômica, o uso de aditivos alimentares tem
94 se mostrado uma estratégia promissora. Dentre esses aditivos, destacam-se os óleos
95 essenciais, que vêm ganhando atenção por sua capacidade de modular a
96 fermentação ruminal, atuar como antimicrobianos naturais e contribuir para a
97 sustentabilidade da produção de carne ovina.

98 2.2 ADITIVOS PARA RUMINANTES

99 De acordo com o Decreto nº 76.986, de 6 de janeiro de 1976, um aditivo é
100 definido como uma substância adicionada intencionalmente aos alimentos com a
101 finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não
102 comprometa seu valor nutritivo (BRASIL, 1976). Dentro dessa classificação, destacam-
103 se os aditivos naturais, compostos encontrados em diversas espécies vegetais e
104 estudados como alternativas aos antibióticos. Entre eles, incluem-se prebióticos,
105 probióticos, leveduras, ácidos orgânicos, óleos essenciais e extratos vegetais.

106 Segundo a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (União Europeia,
107 2003), os aditivos utilizados na alimentação animal são agrupados em cinco
108 categorias, conforme sua função: (a) aditivos tecnológicos, como conservantes,
109 antioxidantes e emulsificantes; (b) aditivos sensoriais, como corantes, flavorizantes e
110 palatilizantes; (c) aditivos nutricionais, incluindo vitaminas, microminerais e
111 aminoácidos; (d) aditivos zootécnicos, que abrangem melhoradores da digestibilidade,
112 equilibradores da microbiota intestinal e substâncias que otimizam o desempenho
113 produtivo, como antibióticos, ionóforos e extratos vegetais; e (e) aditivos
114 anticoccidianos.

115 Nos ruminantes, os aditivos de maior relevância são aqueles que modulam a
116 fermentação ruminal, promovendo alterações benéficas no metabolismo microbiano e
117 no aproveitamento dos nutrientes. O rúmen é um ecossistema anaeróbico complexo,
118 habitado por bactérias, protozoários, fungos e arqueias, que fermentam carboidratos
119 e proteínas para produzir compostos essenciais ao metabolismo do hospedeiro
120 (Kansagara et al., 2022; Miranda et al., 2024). Entre os principais produtos desse
121 processo estão os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e a proteína microbiana,
122 que representam, respectivamente, as principais fontes de energia e de aminoácidos
123 para os ruminantes (Kansagara et al., 2022; Moraes; Vieira, 2021).

124 Entretanto, parte da fermentação ruminal resulta na formação de subprodutos
125 indesejáveis, como metano e amônia em excesso, que representam perdas
126 energéticas e proteicas significativas. A emissão de metano, por exemplo, pode
127 representar até 12% da energia bruta ingerida, além de ser um importante agente de
128 impacto ambiental devido ao seu elevado potencial de aquecimento global (Huws et

al., 2018). Assim, estratégias de manipulação da fermentação têm sido desenvolvidas com o objetivo de reduzir essas perdas, aumentar a produção de AGCCs benéficos, como o propionato, e otimizar a síntese de proteína microbiana (Pereira et al., 2020; Silva et al., 2020).

Avanços recentes na metagenômica revelaram um microbioma ruminal ainda mais diverso e funcionalmente complexo do que se conhecia, oferecendo novos *insights* sobre as interações microbianas e suas funções metabólicas (Miranda et al., 2024). Nesse contexto, o uso de aditivos fitogênicos e nutracêuticos, como taninos, saponinas, óleos essenciais e extratos vegetais, tem se destacado como uma estratégia promissora. Esses compostos podem modular seletivamente a microbiota ruminal, inibir a metanogênese e reduzir a degradação excessiva de proteína verdadeira, sem comprometer a digestibilidade da fibra. Estudos demonstram que tais substâncias apresentam ação antimicrobiana seletiva contra microrganismos específicos, como arqueias metanogênicas, além de contribuírem para a redução de processos inflamatórios, melhora do estado antioxidante e, potencialmente, aumento da eficiência alimentar em sistemas intensivos de produção (Freire Caldas et al., 2019).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são compostos voláteis, lipossolúveis e biologicamente ativos, oriundos do metabolismo secundário das plantas. Embora não participem diretamente dos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, exercem papel fundamental na adaptação das plantas a condições ambientais adversas. Atuam como mecanismos de defesa frente a estresses abióticos como variações de luminosidade, disponibilidade hídrica e composição do solo e contra fatores bióticos, como o ataque de microrganismos patogênicos, insetos e herbívoros (Maleck et al., 2021; Moraes; Vieira, 2021).

Os metabólitos secundários vegetais podem ser agrupados em três grandes classes químicas: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Maleck et al., 2021). Os óleos essenciais, pertencentes ao grupo dos terpenos, podem conter entre 20 e 60 componentes químicos distintos, incluindo álcoois, aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos, ésteres e éteres, que conferem propriedades físico-químicas e

biológicas específicas a cada espécie botânica. Esses compostos são encontrados em diversas partes das plantas como, folhas, flores, sementes, raízes e cascas e sua composição varia conforme a origem botânica, o estágio de desenvolvimento e as condições ambientais, como clima e tipo de solo (Silva; Monteiro, 2021).

Dentre os métodos disponíveis para a extração de óleos essenciais, a destilação por arraste de vapor é a técnica mais utilizada, especialmente em escala comercial, por sua simplicidade, custo relativamente baixo e eficiência na preservação dos compostos voláteis. Outras técnicas, como extração por solventes orgânicos e fermentação, também são utilizadas, sobretudo quando se busca obter frações específicas com maior seletividade ou rendimento (Maleck et al., 2021; Moraes; Vieira, 2021)

A composição química e a concentração dos constituintes voláteis dos óleos essenciais são determinadas geneticamente, mas são influenciadas por fatores ambientais e pelas interações ecológicas entre a planta e organismos do seu entorno. Essa complexidade resulta em um amplo espectro de propriedades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antifúngicos e, em alguns casos, atividades anticancerígenas (Contrucci et al., 2019).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre, principalmente, pela interferência na integridade da membrana celular bacteriana. Esses compostos desestabilizam a bicamada lipídica, aumentam a permeabilidade da membrana plasmática e provocam extravasamento de íons e constituintes intracelulares. Tais alterações comprometem processos essenciais à célula, como a translocação de proteínas, o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa, resultando na perda do controle quimiostático e, por fim, na morte celular (Pombo et al., 2018). No entanto, a eficácia antimicrobiana está diretamente relacionada à composição predominante dos constituintes, à sinergia entre eles e à concentração aplicada. Por isso, é essencial que estudos de padronização e determinação da dose ótima sejam conduzidos para viabilizar o uso seguro e eficiente desses compostos em sistemas produtivos (Mariano et al., 2021; Silva et al., 2022).

188 2.3.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

189 O alecrim é uma planta perene da família Lamiaceae, amplamente cultivada e
190 valorizada tanto por seu uso culinário quanto por suas propriedades terapêuticas. Seu
191 óleo essencial é rico em compostos bioativos, especialmente fenólicos e
192 monoterpenos oxigenados, que lhe conferem propriedades antimicrobianas,
193 antioxidantes e anti-inflamatórias. Estudos identificaram a presença de flavonoides,
194 taninos e saponinas em sua composição fitoquímica, os quais reforçam seu potencial
195 terapêutico (Couto et al., 2022). A atividade antimicrobiana do óleo essencial de
196 alecrim tem sido atribuída à ação de seus constituintes oxigenados sobre a membrana
197 celular de microrganismos, promovendo desorganização estrutural e perda de
198 integridade celular (De Oliveira; Camargo; De Oliveira, 2019). Além disso, efeitos
199 significativos contra microrganismos clinicamente relevantes, como *Candida albicans*,
200 *C. tropicalis* e *Aspergillus flavus*, já foram relatados (Silva; Monteiro, 2021). Apesar de
201 seu amplo uso e mercado promissor, ainda há escassez de estudos sistemáticos
202 sobre a padronização da qualidade do alecrim e de seus derivados (Couto et al.,
203 2022).

204 O óleo essencial de alecrim apresenta como principais constituintes os
205 monoterpenoides α -pineno, β -pineno, canfeno, 1,8-cineol, cânfora, borneol, acetato
206 de bornila e verbenona; esses compostos são responsáveis por romper estruturas
207 celulares e inibir enzimas microbianas, conferindo ao óleo um potencial bioativo contra
208 bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos (Silva; Monteiro, 2021). Essa ação
209 seletiva sugere que o óleo essencial de alecrim pode ser utilizado como aditivo
210 modulador da fermentação ruminal.

211 Diversos estudos confirmam esse potencial. Cobellis et al., (2015) observaram
212 que a suplementação de 7 g/dia de óleo essencial de alecrim em dietas com relação
213 volumoso:concentrado de 79:21 em cordeiros aumentou a população de *Fibrobacter*
214 *succinogenes*, mantendo estáveis as populações de *Ruminococcus albus*, *R.*
215 *flavefaciens* e protozoários ruminais. Já Cobellis; Trabalza-Marinucci; Yu, (2016)
216 demonstraram que folhas secas moídas ou peletizadas de alecrim reduziram *Archaea*
217 e *Prevotella*, enquanto o óleo essencial aumentou novamente *Fibrobacter*
218 *succinogenes*, sem impactar AGCC ou o N-amoniacal.

Cetin et al., (2023), ao suplementar cordeiros Merino com 500 e 750 mg/dia de óleo essencial de alecrim, não observaram alterações na fermentação ruminal ou no desempenho, mas relataram aumento significativo da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase, além de tendência positiva na modulação da microbiota fecal. De forma semelhante, Bıyık et al., (2023) encontraram efeito positivo da suplementação com 500 e 1000 mg/dia de óleo essencial em bezerros, observando aumento da ingestão de concentrado e ganho médio diário.

Resultados promissores também foram relatados por Dorantes-Iturbide et al., (2022), cuja meta-análise demonstrou que a inclusão de óleos essenciais em dietas de pequenos ruminantes pode melhorar o ganho de peso, a estabilidade oxidativa da carne, a composição do leite e reduzir o estresse oxidativo e os impactos ambientais da produção. De forma complementar, Silva et al. (2025), em uma revisão sistemática com 39 estudos, destacaram que aditivos fitogênicos, especialmente os óleos de alecrim e alho, aumentaram em 5,77% o ganho médio diário e em 8,9% a área de olho de lombo, além de reduzir a força de cisalhamento da carne em 5,4%, evidenciando melhora na maciez. Esses aditivos também elevaram a digestibilidade da proteína bruta em 5,5%, sem interferir negativamente na ingestão de nutrientes. Tais achados reforçam o potencial dos aditivos fitogênicos como alternativa segura e eficaz aos promotores de crescimento convencionais, contribuindo para maior eficiência produtiva e qualidade da carne ovina.

Complementando esses achados, Cavalheiro Junior et al., (2021) avaliaram *in vitro* os efeitos de diferentes dosagens de óleo essencial de alecrim em dietas com distintas proporções volumoso:concentrado (50:50, 40:60 e 20:80) para cordeiros confinados. O estudo revelou que o óleo influenciou a cinética de degradação dos carboidratos, com destaque para uma resposta quadrática no volume de gás produzido pela degradação de carboidratos não fibrosos (Vnfc), atingindo o pico a 0,71 g/L. A taxa de degradação de carboidratos não fibrosos apresentou ponto mínimo a 0,89 g/L, e a produção de gás a partir de carboidratos fibrosos (Vfc) reduziu até 1,17 g/L, enquanto o tempo de colonização microbiana foi maximizado em 1,18 g/L. Os autores recomendam o uso de 1,0 g/L como dosagem ideal de óleo essencial de alecrim para modulação ruminal, uma vez que esse valor médio demonstrou otimizar a fermentação sem aumentar a produção de gases indesejáveis.

Apesar dos benefícios apontados, a variabilidade dos resultados entre estudos destaca a necessidade de mais pesquisas para definição de protocolos padronizados e faixas de dosagem ideais para diferentes espécies e sistemas de produção.

2.3.2 Alho (*Allium sativum* L.)

O alho, pertencente à família Liliaceae, é amplamente reconhecido por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e terapêuticas. Seu óleo essencial é rico em compostos sulfurados, entre os quais o trissulfeto de dialila (44,21%) e o dissulfeto de dialila (22,08%) se destacam como principais constituintes (Herrera-Calderón et al., 2021). A alicina, um dos compostos bioativos mais estudados, é formada a partir da alina por ação da enzima alinase quando o tecido do alho é danificado ((Borlinghaus et al., 2021). Altamente reativa, a alicina atua através da S-tioalilação de resíduos de cisteína em proteínas e da glutathione, afetando a sinalização celular e a atividade de enzimas sensíveis a redox. Além da alicina, outros compostos como ajoene, dissulfeto de dialila e S-alilcisteína também são responsáveis pelas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias do alho (Jikah et al., 2023), sendo utilizados nas indústrias farmacêutica e alimentícia (Leite; Santos, 2021).

Evidências experimentais demonstram que o alho e seus derivados exercem efeitos sobre a fermentação ruminal. Eom et al., (2020), ao utilizar suplementação com óleo essencial de alho *in vitro*, observaram redução na emissão de metano e na concentração de microrganismos metanogênicos, ainda que sem alterações significativas nos parâmetros de fermentação ou degradabilidade da matéria seca. Zhong et al., (2019) identificaram melhorias no ganho médio diário, digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta em cordeiros suplementados com 50 g/kg de alho em pó, além de redução na relação acetato:propionato no fluido ruminal. Por sua vez, Foskolos et al., (2015) demonstraram que o tiosulfonato de propil-propano (PTSO), composto derivado do óleo de alho, em doses elevadas (300 mg/L) reduziu drasticamente a fermentação ruminal, com efeito ideal entre 50 e 100 mg/L. Barreto-Cruz et al., (2023) relataram que a combinação de óleos essenciais de alho e orégano aumentou a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes *in vitro*, enquanto Yang et al., (2007) verificou que a adição de óleos essenciais de alho e zimbro em vacas leiteiras melhorou a digestibilidade e a conversão alimentar.

Complementando esses achados, Cavalheiro Junior et al., (2021) avaliaram os efeitos da suplementação com óleo essencial de alho sobre a cinética de degradação de carboidratos em dietas com diferentes proporções de volumoso:concentrado (50:50, 40:60 e 20:80). O estudo revelou que a dosagem de 1,54 g/L de óleo essencial de alho resultou nos menores volumes de gás provenientes da degradação de carboidratos fibrosos e não fibrosos (V_{final}), indicando um efeito inibitório relevante sobre a atividade microbiana ruminal. Além disso, houve resposta quadrática da variável tempo de colonização microbiana, com ponto máximo em 0,14 g/L na dieta 40:60. Com base nesses resultados, os autores recomendam a dose de 1,0 g/L de óleo essencial de alho como ideal para promover benefícios fermentativos sem comprometer a atividade microbiana celulolítica, sendo aplicável a dietas concentradas de cordeiros em terminação.

Esses achados evidenciam o potencial do óleo essencial de alho como aditivo funcional na alimentação de ruminantes, com capacidade de modular a microbiota ruminal, reduzir emissão de metano, melhorar o desempenho produtivo e atuar como antioxidante natural. No entanto, a ampla variação de resultados entre diferentes estudos e métodos de extração reforça a necessidade de mais pesquisas padronizadas para definir protocolos seguros e eficazes de suplementação.

2.4 MICROBIOTA RUMINAL

A genômica tem se consolidado como uma ferramenta essencial para o avanço da zootecnia moderna, especialmente na compreensão da microbiota ruminal e sua relação com a saúde, desempenho e eficiência alimentar dos ruminantes. Por meio do sequenciamento de nova geração, particularmente da região V3–V4 do gene 16S rRNA, é possível identificar com alta resolução os microrganismos presentes no rúmen, incluindo bactérias, arqueas e outros componentes microbianos que influenciam diretamente a fermentação e digestão de compostos dietéticos complexos (Denman; Morgavi; Mcsweeney, 2018; Koike et al., 2021b).

Ao permitir a caracterização taxonômica e funcional do microbioma, a genômica possibilita a avaliação de como fatores nutricionais, como a inclusão de aditivos naturais nas dietas, afetam a estrutura e atividade das comunidades microbianas

312 ruminais. Em ovinos, por exemplo, estudos demonstram que a inclusão de óleos
313 essenciais pode modular seletivamente gêneros microbianos associados à
314 fermentação de carboidratos, degradação de fibra e produção de metano (Sha et al.,
315 2024; Wilkinson et al., 2020).

316 A caracterização do ambiente ruminal por meio da genômica permite não apenas
317 a identificação das principais rotas metabólicas ativas, mas também a compreensão
318 de desequilíbrios microbianos associados a dietas com proporções distintas de
319 volumoso e concentrado. A diversidade funcional dentro do gênero *Fibrobacter*, por
320 exemplo, é correlacionada com seu potencial de degradação de lignocelulose em
321 diferentes sistemas digestivos de herbívoros, sendo essencial para a digestão de
322 fibras vegetais (Neumann; Suen, 2018). Essa abordagem contribui para estratégias
323 de formulação alimentar mais eficientes, sustentáveis e adaptadas às exigências
324 produtivas, visando reduzir perdas energéticas (como a emissão de metano) e
325 aumentar a disponibilidade de nutrientes ao hospedeiro.

326 Assim, a aplicação da genômica na produção animal não se limita à seleção
327 genética de animais superiores, mas se estende à compreensão detalhada do
328 ambiente ruminal como um ecossistema dinâmico, em constante interação com a
329 dieta e o metabolismo do animal, oferecendo subsídios valiosos para práticas
330 nutricionais de precisão e manejo de sistemas mais sustentáveis.

331 2.5 METABOLÔMICA

332 A metabolômica é uma abordagem analítica emergente que fornece informações
333 detalhadas sobre a composição metabólica de amostras biológicas, oferecendo
334 *insights* sobre processos celulares e estados fisiológicos (Aline Klassen et al., 2017;
335 Canuto et al., 2018). Este campo emprega técnicas analíticas avançadas, como
336 espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear, para identificar e
337 quantificar metabólitos em diferentes matrizes biológicas, comparando grupos de
338 controle com estados alterados induzidos por doenças, tratamentos ou variações
339 ambientais (Canuto et al., 2018; Carvalho et al., 2024). A metabolômica desempenha
340 papel essencial na compreensão da biologia de sistemas, integrando-se a outras
341 abordagens ômicas para construir modelos abrangentes do metabolismo celular.

Inicialmente voltada para análises direcionadas, a área evoluiu para abordagens não direcionadas, que permitem novas descobertas e uma compreensão mais holística dos sistemas biológicos. Metabólitos exercem múltiplas funções, atuando como moléculas de sinalização, sensores ambientais e moduladores imunológicos, revelando aspectos cruciais da fisiologia e fisiopatologia dos organismos (Carvalho et al., 2024)

Estudos recentes exploram as interações entre microbiota ruminal, metabolômica e fatores do hospedeiro. Artegoitia et al., (2017) identificaram 33 metabólitos correlacionados ao ganho médio diário (GMD) em novilhos, sugerindo potenciais biomarcadores de desempenho animal. Zhao et al., (2014) demonstraram que o tipo de forragem altera significativamente o perfil metabólico do rúmen, especialmente quanto a AGCCs e aminoácidos. A metagenômica também contribui para revelar uma microbiota ruminal mais diversa que o estimado anteriormente, com a dieta como fator determinante na composição microbiana (Miranda et al., 2024). A integração de técnicas ômicas revela caminhos promissores para compreender a função ruminal (Huws et al., 2018).

Neste contexto, o estudo de De Almeida et al., (2018) trouxe avanços significativos ao explorar o metaboloma do fluido ruminal de uma vaca Holandesa não lactante utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS) e abordagem de *Molecular Networking*. Foram aplicados cinco métodos de extração distintos, que resultaram em 1.882 características moleculares, das quais 67 foram identificadas com base em bibliotecas públicas. O método de extração líquido-líquido (LLE) demonstrou maior eficiência, sendo responsável por 61,96% das moléculas observadas. Compostos como ácidos dicarboxílicos, lactonas, ácidos graxos derivados e monensina foram anotados. A baixa taxa de identificação (3,56%) reforça o potencial do rúmen como reservatório de novos compostos bioativos. A abordagem não direcionada permitiu a organização de famílias químicas em *clusters* e destacou a importância de novas ferramentas na elucidação do metaboloma ruminal.

A metabolômica tem se mostrado eficaz também na identificação de biomarcadores associados à eficiência alimentar. Em bovinos, Artegoitia et al., (2017) observaram que determinados metabólitos no fluido ruminal, analisados por UHPLC-

374 MS/MS, estão diretamente relacionados ao desempenho produtivo. De modo
375 semelhante, Yang et al., (2018) demonstraram que dietas com diferentes níveis de
376 milho modificam o perfil metabólico do rúmen e do plasma, impactando vias
377 metabólicas como a da fenilalanina e sua biossíntese associada à tirosina e triptofano.
378 Tais achados reforçam o papel da dieta na modulação do metabolismo ruminal, na
379 fisiologia animal e apontam estratégias nutricionais promissoras para a otimização da
380 produção de ruminantes.

381 Essas evidências destacam a crescente importância da metabolômica no estudo
382 da dinâmica do rúmen e da interação entre seus microrganismos. Abordagens não
383 direcionadas permitem identificar metabólitos secundários com potencial para
384 melhorar o desempenho e o bem-estar animal, além de contribuir para a redução da
385 emissão de metano e maior eficiência alimentar (Wallace et al., 2017). Essas
386 estratégias também favorecem a descoberta de novas enzimas e antimicrobianos
387 (Oyama et al., 2017).

388 3 REFERÊNCIAS

- 389 ALINE KLASSEN *et al.* **Metabolomics: Definitions and Significance in Systems**
390 **Biology**. 1. ed. [S.l.]: Springer International Publishing, 2017.
- 391 ARTEGOITIA, Virginia M. *et al.* Rumen fluid metabolomics analysis associated with
392 feed efficiency on crossbred steers. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- 393 BARRETO-CRUZ, Olga Teresa *et al.* Assessing the In Vitro and In Vivo Effect of
394 Supplementation with a Garlic (*Allium sativum*) and Oregano (*Origanum vulgare*)
395 Essential Oil Mixture on Digestibility in West African Sheep. **Veterinary Sciences**, v.
396 10, n. 12, 1 dez. 2023.
- 397 BIYIK, F. *et al.* Effects of rosemary essential oil as a feed additive on performance,
398 rumen fermentation, and blood parameters in preweaning Holstein calves. **Journal of**
399 **the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 74, n. 3, p. 6191–6199, 2023.
- 400 BORLINGHAUS, Jan *et al.* Allicin, the odor of freshly crushed garlic: A review of recent
401 progress in understanding allicin's effects on cells§. **Molecules**MDPI AG, , 2021.
- 402 BRASIL. **Decreto nº 76.986, de 6 de janeiro de 1976. Dispõe sobre a definição e o**
403 **emprego de aditivos alimentares nos alimentos destinados ao consumo**
404 **humano**. Brasília: [S.n.].
- 405 CANUTO, Gisele A. B. *et al.* METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E
406 APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**Sociedade Brasileira de
407 Química, , 1 jan. 2018.
- 408 CARVALHO, Maria Eduarda Ferreira de *et al.* EXPLORANDO O POTENCIAL
409 TRANSFORMADOR DA METABOLÔMICA PERSONALIZADA NA OSTEOGÊNESE
410 IMPERFEITA. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**,
411 v. 10, n. 1, p. 1337–1360, 21 fev. 2024.
- 412 CAVALHEIRO JUNIOR, Elias Rodrigues *et al.* Effect of Supplying Rosemary
413 (*Rosmarinus officinalis* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) Essential Oils to Feedlot
414 Lambs on in vitro Ruminal Fermentation. **Frontiers in Animal Science**, v. 2, 2021.
- 415 CETIN, I. *et al.* The effects of rosemary essential oil supplementation on growth
416 performance, rumen flora and antioxidant blood parameters in growing Merino lambs.
417 **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 74, n. 4, p. 6607–6614, 2023.
- 418 COBELLIS, G. *et al.* Use of *Rosmarinus officinalis* in sheep diet formulations: Effects
419 on ruminal fermentation, microbial numbers and in situ degradability. **Small Ruminant**
420 **Research**, v. 126, n. S1, p. 10–18, 1 maio 2015.
- 421 COBELLIS, Gabriella; TRABALZA-MARINUCCI, Massimo; YU, Zhongtang. Critical
422 evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Science**
423 **of The Total Environment**, v. 545–546, p. 556–568, 1 mar. 2016.
- 424 CONTRUCCI, Bruno Antunes *et al.* Efeito de Óleos Essenciais Sobre Bactérias Gram-
425 Negativas Isoladas de Alimentos. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias**

- 426 **e da Saúde**, v. 23, n. 3, p. 180, 18 dez. 2019.
- 427 COUTO, Nivia Colares *et al.* Análise de qualidade e microbiológica do *Rosmarinus*
428 *officinalis* (alecrim). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p.
429 e58911831375, 30 jun. 2022.
- 430 DE ALMEIDA, Rafaela Takako Ribeiro *et al.* Exploring the rumen fluid metabolome
431 using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and Molecular
432 Networking. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- 433 DE OLIVEIRA, Jonatas Rafael; CAMARGO, Samira Esteves Afonso; DE OLIVEIRA,
434 Luciane Dias. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic
435 agent. **Journal of Biomedical Science** BioMed Central Ltd., , 9 jan. 2019.
- 436 DEBORTOLI, Elísio de Camargo *et al.* Meat sheep farming systems according to
437 economic and productive indicators: A case study in Southern Brazil. **Revista**
438 **Brasileira de Zootecnia**, v. 50, 14 jun. 2021.
- 439 DENMAN, S. E.; MORGAVI, D. P.; MCSWEENEY, C. S. Review: The application of
440 omics to rumen microbiota function. **Animal**, v. 12, n. s2, p. s233–s245, 1 jan. 2018.
- 441 DORANTES-ITURBIDE, Griselda *et al.* Essential Oils as a Dietary Additive for Small
442 Ruminants: A Meta-Analysis on Performance, Rumen Parameters, Serum Metabolites,
443 and Product Quality. **Veterinary Sciences** MDPI, , 1 set. 2022.
- 444 EOM, Jun Sik *et al.* Effects of supplementation levels of *Allium fistulosum* L. extract on
445 in vitro ruminal fermentation characteristics and methane emission. **PeerJ**, v. 8, p.
446 e9651, 27 ago. 2020.
- 447 FOSKOLOS, A. *et al.* The effects of a garlic oil chemical compound, propyl-propane
448 thiosulfonate, on ruminal fermentation and fatty acid outflow in a dual-flow continuous
449 culture system. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5482–5491, 1 ago. 2015.
- 450 FREIRE CALDAS, Fabiano *et al.* Atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* L.)
451 frente a bactéria causadora de infecção do trato urinário. **Journal of Biotechnology**
452 **and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 217–224, 5 out. 2019.
- 453 HUWS, Sharon A. *et al.* Addressing global ruminant agricultural challenges through
454 understanding the rumen microbiome: Past, present, and future. **Frontiers in**
455 **Microbiology**, , 25 set. 2018.
- 456 IBGE. **Pesquisa da Pecuária Municipal** Instituto Brasileiro de Geografia e
457 **Estatística**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>>. Acesso em: 20 nov. 2024.
- 459 KANSAGARA, Y. K. *et al.* Rumen Microbiota and Nutrient Metabolism: A Review.
460 **Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika**, n. Of, 24 ago. 2022.
- 461 KOIKE, S. *et al.* Rumen microbiota and its relation to fermentation in lactose-fed
462 calves. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 10, p. 10744–10752, 1 out. 2021.
- 463 LEITE, Alexandre Santos; SANTOS, Jânio Sousa. Potencial antimicrobiano de *Allium*

- 464 sativum L.: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p.
465 e108101421699, 27 out. 2021.
- 466 MALECK, Marise *et al.* Óleos essenciais-um breve relato. **Revista Teccen.**, v. 14 (2),
467 p. 43–49, 2 dez. 2021.
- 468 MIRANDA, Gilmara da Silva *et al.* Microbiologia ruminal sob a perspectiva
469 metagenômica: Uma revisão das novas descobertas e tendências. **LUMEN ET**
470 **VIRTUS**, v. 15, n. 39, p. 4022–4041, 11 set. 2024.
- 471 MONTEIRO, Maicon Gonçalves; BRISOLA, Marlon Vinícius; FILHO, José Eustáquio
472 Ribeiro Vieira. TD 2660 - Diagnóstico da Cadeia Produtiva de Caprinos e Ovinos no
473 Brasil. **Texto para Discussão**, p. 1–31, 10 jun. 2021.
- 474 MORAIS, Selene Maia de; VIEIRA, Ícaro Gusmão Pinto. **Introdução à Prospecção**
475 **de Produtos Naturais**. 1. ed. Viçosa: Editora Poisson, 2021. v. 1
- 476 NEUMANN, Anthony P.; SUEN, Garret. The Phylogenomic Diversity of Herbivore-
477 Associated Fibrobacter spp. Is Correlated to Lignocellulose-Degrading Potential.
478 **mSphere**, v. 3, n. 6, p. 10.1128/msphere.00593-18, 2018.
- 479 OYAMA, Linda B. *et al.* Buwchitin: A ruminal peptide with antimicrobial potential
480 against Enterococcus faecalis. **Frontiers in Chemistry**, v. 5, n. JUL, 1 jul. 2017.
- 481 PEREIRA NERES, Camila *et al.* O AGRONEGÓCIO DA CARNE OVINA E CAPRINA
482 NO BRASIL, UMA REVISÃO SOBRE PRODUÇÃO, PERSPECTIVAS E DESAFIOS.
483 **Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro**, v. 11, 2024.
- 484 POMBO, Joseane Cristina Pinheiro *et al.* Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos
485 essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e**
486 **Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 108–117, 2 ago. 2018.
- 487 SANTOS DE AQUINO, Rafael *et al.* Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia
488 A realidade da caprinocultura e ovinocultura no semiárido brasileiro: um retrato do
489 sertão do Araripe, Pernambuco. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**,
490 v. 10, p. 271–281, abr. 2016.
- 491 SHA, Yuzhu *et al.* Multi-omics revealed rumen microbiota metabolism and host
492 immune regulation in Tibetan sheep of different ages. **Frontiers in Microbiology**, v.
493 15, 2024.
- 494 SILVA, Maria Carolina Raiol da; MONTEIRO, Daniel Vitor Da Silva. ATIVIDADES
495 ANTIMICROBIANAS E ANTIFUNGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM
496 (ROSMARINUS OFFICINALIS L.). **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 2, p.
497 53, jun. 2021.
- 498 UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do**
499 **Conselho, de 22 de setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à**
500 **alimentação animal** **Jornal Oficial da União Europeia**. Bruxelas, União Europeia:
501 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831>, 22 set.
502 2003. Disponível em: <[https://eur-lex.europa.eu/legal-](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831)
503 [content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831)>. Acesso em: 9 ago. 2024.

- 504 WALLACE, Robert J. *et al.* Application of meta-omics techniques to understand
505 greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. **Genetics Selection**
506 **Evolution** BioMed Central Ltd., , 16 jan. 2017.
- 507 WILKINSON, Toby *et al.* 1200 high-quality metagenome-assembled genomes from the
508 rumen of African cattle and their relevance in the context of sub-optimal feeding.
509 **Genome Biology**, v. 21, n. 1, 3 set. 2020.
- 510 YANG, W. Z. *et al.* Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal
511 fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. **Journal of Dairy**
512 **Science**, v. 90, n. 12, p. 5671–5681, 2007.
- 513 YANG, You *et al.* Rumen and plasma metabolomics profiling by UHPLC-QTOF/MS
514 revealed metabolic alterations associated with a high-corn diet in beef steers. **PLoS**
515 **ONE**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2018.
- 516 ZHAO, S. *et al.* Metabolomics analysis reveals large effect of roughage types on rumen
517 microbial metabolic profile in dairy cows. **Letters in Applied Microbiology**, v. 59, n.
518 1, p. 79–85, jul. 2014.
- 519 ZHONG, Rongzhen *et al.* Effects of feeding garlic powder on growth performance,
520 rumen fermentation, and the health status of lambs infected by gastrointestinal
521 nematodes. **Animals**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2019.

522 **4 HIPÓTESE**

523 A suplementação com óleos essenciais de alho e alecrim altera as
524 características produtivas, modula a microbiota ruminal influenciando a fermentação
525 e o metabolismo ruminal de cordeiros confinados?

526 A inclusão de óleos essenciais de alho e alecrim na dieta de cordeiros confinados
527 modula seletivamente a microbiota ruminal, que resultam em melhor fermentação dos
528 nutrientes, alterações no metaboloma ruminal, maior desempenho produtivo e efeitos
529 positivos nas características de carcaça e qualidade da carne.

530 5 OBJETIVO

531 5.1 OBJETIVO GERAL

532 Avaliar o uso de óleos essenciais de alecrim e alho como aditivos alimentares na
533 fermentação e microbiologia ruminal por meio do estudo de desempenho de cordeiros
534 alimentados em confinamento com rações de alto concentrado contendo óleos
535 essenciais de alho e alecrim.

536 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

537 • Avaliar o desempenho e qualidade da carcaça e carne de ovinos
538 confinados, alimentados com rações contendo óleos essenciais de alho e
539 alecrim.

540 • Caracterizar o microbiota ruminal de ovinos confinados e alimentados
541 com rações contendo óleos essenciais de alho e alecrim, por meio de
542 análise genômica.

543 • Avaliar, por meio de análise metabolômica não direcionada, as alterações
544 no metabolismo ruminal decorrentes da inclusão de óleos essenciais de
545 alho e alecrim na dieta de cordeiros confinados.

6 ARTIGO 1- Óleos essenciais de alho (*Allium sativum* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) no desempenho produtivo e qualidade de carcaças de cordeiros confinados

RESUMO

A busca por alternativas naturais aos aditivos convencionais em dietas de ruminantes tem impulsionado o uso de óleos essenciais (OEs), como os de alho e alecrim, devido às suas propriedades antimicrobianas e moduladoras da fermentação ruminal. Este estudo avaliou os efeitos da inclusão de OEs de alho e alecrim, em diferentes dosagens (0,14; 0,40 e 1,00 mL/L de líquido ruminal), sobre o desempenho produtivo, características de carcaça e qualidade da carne de cordeiros confinados. Foram testadas cinco dietas: sem aditivos; alho (0,14 e 1,00 mL/L); e alecrim (0,40 e 1,00 mL/L). As dietas foram formuladas com base em 30% de silagem de milho e 70% de concentrado composto por milho moído e farelo de soja, sendo fornecidas ad libitum por 90 dias. A dieta com 0,40 mL/L de óleo essencial de alecrim resultou nos maiores ganhos médios diários nos períodos de 31 a 60 dias (0,233 kg/dia) e de 61 a 90 dias (0,193 kg/dia), maior consumo de matéria seca e melhor conversão alimentar no período intermediário (P60). Essa dieta também proporcionou maior peso final (45,16 kg), maiores pesos de carcaça quente e fria e maior espessura de gordura subcutânea (4,68 mm), sem alterar os parâmetros de cor, pH ou oxidação lipídica da carne. Os OEs de alho apresentaram efeitos intermediários e não diferiram entre as dosagens. Os rendimentos de carcaça e as características morfológicas do músculo Longissimus lumborum não foram influenciados pelas dietas. Conclui-se que a menor dosagem de óleo essencial de alecrim promoveu melhor desempenho produtivo de cordeiros em confinamento, destacando-se como uma estratégia nutricional promissora para sistemas intensivos.

Palavras-chave: aditivos naturais, ganho médio diário, qualidade de carne.

ABSTRACT

The search for natural alternatives to conventional additives in ruminant diets has driven the use of essential oils (EOs), such as garlic and rosemary, due to their antimicrobial properties and ability to modulate ruminal fermentation. This study evaluated the effects of including garlic and rosemary EOs, at different dosages (0.14, 0.40, and 1.00 mL/L of ruminal fluid), on the productive performance, carcass traits, and meat quality of confined lambs. Five diets were tested: no additives; garlic (0.14 and 1.00 mL/L); and rosemary (0.40 and 1.00 mL/L). The diets were formulated based on 30% corn silage and 70% concentrate composed of ground corn and soybean meal, and were offered ad libitum for 90 days. The diet with 0.40 mL/L of rosemary essential oil resulted in the highest average daily gains during days 31 to 60 (0.233 kg/day) and days 61 to 90 (0.193 kg/day), greater dry matter intake, and better feed conversion during the intermediate period (P60). This diet also led to higher final body weight (45.16 kg), greater hot and cold carcass weights, and greater subcutaneous fat thickness (4.68 mm), without affecting meat color parameters, pH, or lipid oxidation. Garlic EOs showed intermediate effects, with no differences between the dosages. Carcass yields and morphological characteristics of the Longissimus lumborum muscle were not influenced by the diets. It is concluded that the lower dose of rosemary essential oil promoted better productive performance in confined lambs, standing out as a promising nutritional strategy for intensive production systems.

Keywords: natural additives, average daily gain, meat quality

593 INTRODUÇÃO

594 A crescente demanda global por proteína animal tem impulsionado a
595 intensificação dos sistemas de produção de ruminantes, especialmente em países
596 tropicais e em desenvolvimento, onde se busca maior eficiência produtiva para
597 atender ao consumo interno e às exportações (Alao et al., 2017). Nesse cenário, a
598 ovinocultura de corte tem ganhado relevância, e a fase de terminação de cordeiros
599 em confinamento se destaca como um ponto crítico, uma vez que influencia
600 diretamente o desempenho zootécnico, o tempo de engorda e a qualidade da carcaça
601 e da carne produzida (Bettencourt et al., 2020). Para otimizar essa etapa, estratégias
602 nutricionais com maior inclusão de concentrados têm sido adotadas, exigindo o uso
603 de tecnologias que favoreçam a estabilidade da fermentação ruminal e o
604 aproveitamento eficiente dos nutrientes.

605 O uso intensivo de concentrados na dieta pode comprometer o ambiente e a
606 microbiota ruminal, aumentando o risco de distúrbios metabólicos, como a acidose
607 ruminal subaguda. Estudos demonstram que dietas com alto teor de concentrado
608 podem alterar significativamente a microbiota ruminal, reduzir o pH e desencadear
609 alterações fisiológicas prejudiciais à saúde dos ruminantes (Zhang et al., 2024). Nesse
610 contexto, a otimização do ambiente ruminal torna-se essencial para promover uma
611 microbiota mais eficiente, capaz de melhorar o desempenho animal e a utilização dos
612 nutrientes. Tradicionalmente, antibióticos promotores de crescimento são utilizados
613 com esse propósito, mas sua aplicação foi restringida devido a preocupações com a
614 segurança alimentar e resistência antimicrobiana. Na União Europeia, por exemplo,
615 sua utilização foi proibida pela Diretiva 1831/2003/EEC (Comissão Europeia, 2003),
616 incentivando a busca por alternativas naturais e sustentáveis.

617 Entre essas alternativas, destacam-se os óleos essenciais (OEs), como os
618 derivados de alho (*Allium sativum*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*), que têm sido
619 amplamente investigados por suas propriedades antimicrobianas e moduladoras da
620 fermentação ruminal (Iommelli et al., 2025). A suplementação com OEs na dieta de
621 pequenos ruminantes tem demonstrado efeitos positivos sobre o ganho médio diário
622 (Andri; Huda; Marjuki, 2020). Esses efeitos são atribuídos, em grande parte, à ação
623 antimicrobiana dos OEs, que reduzem a população de protozoários ruminais,
624 favorecendo a síntese de proteína microbiana e a disponibilidade energética, o que

contribui para o crescimento dos animais (Soltan et al., 2018). Assim, os OEs emergem como aditivos naturais promissores para sistemas de produção intensivos, com potencial para melhorar o desempenho zootécnico e a qualidade dos produtos (Campolina et al., 2021).

Alguns estudos reforçam esses benefícios. Zhong et al., (2019) avaliaram a inclusão de 50 g/kg de alho em pó na dieta de cordeiros durante 84 dias, observando aumento no ganho médio diário e melhoria na digestibilidade da matéria seca e da proteína bruta, sem afetar o consumo de matéria seca ou a conversão alimentar. De forma semelhante, a inclusão de óleo essencial de alecrim tem sido associada à modulação da microbiota ruminal Cobellis et al., (2015).

Complementarmente, estudos *in vitro* realizados por Cavalheiro Junior et al., (2021) demonstraram que a adição de óleos essenciais de alho e alecrim a dietas com diferentes relações volumoso:concentrado afeta a cinética de degradação dos carboidratos no rúmen. As dosagens de 1,0 g/L de líquido ruminal para ambos os óleos resultaram em perfis fermentativos mais desejáveis, com maior tempo de colonização microbiana e menores volumes de gás, indicando fermentação mais lenta e eficiente. Esses achados reforçam o potencial dos óleos essenciais na modulação ruminal, especialmente em dietas com alto teor de concentrado, comuns em sistemas intensivos de terminação de cordeiros.

Apesar dos resultados promissores, ainda não há consenso sobre a forma de fornecimento e a dosagem mais eficaz dos OEs na alimentação de cordeiros. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desempenho produtivo e as características de carcaça e da carne de cordeiros alimentados com rações contendo diferentes concentrações de óleos essenciais de alho e alecrim, visando identificar a dose mais adequada para dietas com alto teor de concentrado em sistemas de confinamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Fazenda Escola (FAZESC) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais

654 (CEUA) da UEL, sob o número de protocolo 035.2022.

655 Foram utilizados 35 cordeiros machos, não castrados, mestiços das raças Texel
656 × Dorper × Santa Inês, com peso vivo inicial médio de $26,3 \pm 6,20$ kg e idade
657 aproximada de 90 dias. Os animais foram vermifugados no início do experimento com
658 Taitec® (closantel 10%) e, em seguida, alojados individualmente em baias com piso
659 ripado, equipadas com comedouros e bebedouros. O confinamento teve duração de
660 90 dias, precedido por um período de adaptação de 15 dias às condições
661 experimentais e dietas fornecidas.

662 O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco
663 dietas e sete animais por dieta. As dietas experimentais foram formuladas para serem
664 isoprotéicas e isoenergéticas (Tabela 1), tendo como base 30% de silagem de milho
665 e 70% de concentrado composto por farelo de soja, milho moído, fosfato bicálcico,
666 calcário, óleo de soja e bicarbonato de sódio, diferindo apenas na inclusão ou não dos
667 óleos essenciais de alecrim e alho.

668 A parte concentrada da dieta foi preparada separadamente para cada dieta
669 experimental. A ordem de fabricação seguiu uma sequência rigorosa: inicialmente foi
670 preparada a dieta sem adição de óleo essencial; em seguida, a dieta com menor
671 concentração do respectivo óleo essencial e, por fim, a dieta com maior concentração.
672 Ao realizar a troca entre os tipos de óleo essencial (de alho para alecrim ou vice-
673 versa), uma quantidade de milho foi passada pelo misturador com o objetivo de evitar
674 a contaminação cruzada entre os compostos. Este milho intermediário não foi utilizado
675 nas rações experimentais, sendo destinado ao uso comum da fazenda.

676 Os alimentos foram submetidos a análises para determinação dos teores de
677 matéria seca (MS, método 930.15), matéria mineral (MM, método 923.03), proteína
678 bruta (PB, método 990.03), extrato etéreo (EE, método 920.39), hemicelulose (HEM)
679 e matéria orgânica (MO, método 942.05), conforme os procedimentos analíticos
680 descritos pela AOAC (2000, 2006). As frações de fibra em detergente neutro (FDN) e
681 fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas segundo a metodologia proposta
682 por Detmann et al., (2012).

683 A dieta foi fornecida *ad libitum*, duas vezes ao dia 08h00 e 16h00, com controle
684 para manutenção de aproximadamente 10% de sobras em relação ao total ofertado.

O consumo de matéria seca foi monitorado diariamente por meio da pesagem das sobras, realizadas todas as manhãs. Caso o percentual de sobras ficasse acima ou abaixo do valor estabelecido por dois dias consecutivos, a quantidade de ração ofertada era ajustada.

Tabela 1: Composição química dos alimentos, proporção dos ingredientes na dieta e composição química da dieta base utilizados na ração fornecida para cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alecrim ou alho

Composição química dos alimentos base (% da MS)			
	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja
Matéria seca (% na MN)	27,66	90,95	93,39
Proteína bruta	8,10	10,45	52,76
Extrato etéreo	2,40	3,89	1,67
Matéria orgânica	96,12	98,54	93,11
Fibra em detergente neutro	49,43	11,11	10,03
Fibra em detergente ácido	22,65	1,93	4,00
Hemicelulose	26,78	9,19	6,04
Carboidratos totais	85,62	84,20	38,68
Proporção dos ingredientes na dieta base (%)			
Silagem de milho	30,00		
Milho moído	39,22		
Farelo de soja	27,96		
Fosfato bicálcico	0,31		
Calcário	1,01		
Bicarbonato de sódio	0,50		
Óleo de soja	1,00		
Óleo essencial de alecrim ^{ab}	*		
Óleo essencial de alho ^{xy}	*		
Total	100.00		
Composição química da dieta base (% da MS)			
Matéria seca (% na MN)	70,08		
Proteína bruta	21,28		
Extrato etéreo	2,71		
Matéria orgânica	93,52		
Fibra em detergente neutro	21,99		
Fibra em detergente ácido	8,67		
Hemicelulose	13,32		
Carboidratos totais	69,52		

MS: matéria seca; MN: matéria natural; a: 0,40 mL/L de líquido ruminal; b: 1,00 mL/L de líquido ruminal; x: 0,14 mL/L de líquido ruminal; y: 1,00 mL/L de líquido ruminal.

As pesagens foram realizadas no início do experimento e, em seguida, a cada 15 dias, até a pesagem final. As pesagens intermediárias foram utilizadas para avaliação do desempenho animal e para ajustes na dieta, quando necessário. As mesmas eram realizadas sempre no período da manhã, antes do primeiro trato do dia.

A conversão alimentar (CA) e a eficiência alimentar (EA) foram calculadas individualmente para cada animal em três períodos distintos: 0 a30 dias, 31 a60 dias e 61 a 90 dias. Os cálculos foram realizados conforme metodologia proposta pelo National Research Council, (2007) considerando o consumo médio diário de matéria seca (CMDMS) e o ganho médio diário (GMD).

A conversão alimentar foi determinada pela razão entre CMDMS e GMD, conforme a fórmula:

$$CA = \frac{CMDMS}{GMD}$$

Já a eficiência alimentar foi calculada como o inverso da conversão alimentar:

$$EA = \frac{GMD}{CMDMS}$$

Ao atingirem, em média, 40 kg de peso vivo, os animais foram considerados prontos para o abate, marcando o fim do experimento. Em seguida, foram transportados por aproximadamente 50 km até um frigorífico com inspeção municipal, onde permaneceram em baias de espera por 12 horas. O abate foi realizado conforme as normas de abate humanitário, com insensibilização por eletronarcose, seguida imediatamente de sangria, esfolagem e evisceração, conforme estabelece a legislação brasileira.

As carcaças foram pesadas logo após o abate (PCQ = peso da carcaça quente) e após 24 horas de resfriamento (2°C) (PCF = peso da carcaça fria). Os rendimentos de carcaça quente (RCQ) e fria (RCF) foram calculados pelas porcentagens dos pesos da carcaça quente e fria em relação ao peso final (PF), e a perda de peso no resfriamento (PPR) pela diferença entre os dois pesos de carcaça (Osório; Osório, 2005).

As meias carcaças esquerdas foram seccionadas na altura da 12ª costela para

avaliação da área de olho de lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea, profundidade e largura do músculo *Longissimus lumborum*, conforme metodologia descrita por Cezar; Souza, (2007). Após as mensurações, foi coletada uma amostra do mesmo segmento do músculo *Longissimus lumborum*, com aproximadamente 200 g, a qual foi utilizada para a realização de todas as análises referentes à qualidade da carne.

A cor foi avaliada utilizando o aparelho colorímetro portátil Minolta® para avaliação dos componentes L^* (luminosidade), a^* (componente vermelho-verde) e b^* (componente amarelo-azul), que foram expressos no sistema de cor CIELAB. Esses valores foram usados para calcular o ângulo de tonalidade (h^*) pela equação $h^* = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, e o índice de saturação, ou croma (c^*), a partir da equação $c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$.

Para o índice de oxidação lipídica foi realizado o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS), pesando-se 5 g de amostra homogeneizada e adicionando-se 25 mL de tetrametoxipropano a 7,5%. Posteriormente procedeu-se homogeneização por 1 minuto com filtragem em tubo corning. Acrescentou-se em tubo de ensaio 4 mL do filtrado, 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) e 5 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico). Os tubos foram colocados em banho-maria fervente por 45 minutos. Após esfriarem foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 538nm, acompanhada de curva padrão, de acordo com o método descrito por Pikul; Leszczynski; Kummerow, (1989).

Posteriormente, os dados obtidos foram submetidos a avaliação de normalidade dos resíduos por meio do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o software estatístico R (2015), considerando-se o nível de significância de 5%. O peso vivo inicial dos animais foi utilizado como covariável na ANOVA para controle da variabilidade individual. Quando identificadas diferenças significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. As análises referentes ao consumo de matéria seca (CMS), ganho médio diário (GMD), conversão alimentar (CA) e eficiência alimentar (EA) foram realizadas separadamente para três períodos do confinamento: P30 (0 a 30 dias), P60 (31 a 60 dias) e P90 (61 a 90 dias), permitindo avaliar a evolução dos parâmetros zootécnicos ao longo do tempo e os efeitos da suplementação com óleos essenciais em diferentes fases.

754 RESULTADOS E DISCUSSÃO

755 No período inicial (P30) (Tabela 2), não houve efeito das dietas para nenhuma
 756 variável ($P > 0,05$). No entanto, a partir do segundo período de confinamento (P60),
 757 os efeitos das dietas tornaram-se evidentes. O GMD foi significativamente superior
 758 nos animais que receberam a dieta Alecrim (B), com média de 0,233 kg/dia, diferindo
 759 das demais, especialmente da dieta sem aditivos, que apresentou o menor GMD
 760 (0,139 kg/dia) ($P = 0,0006$). As demais dietas contendo óleo essencial de alho e maior
 761 dosagem de óleo essencial de alecrim não apresentaram diferença estatística entre
 762 si.

763 Tabela 2 –Desempenho e eficiência alimentar de cordeiros confinados e alimentados
 764 com rações contendo diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim.

	Dietas					P	CV (%)
	Sem Aditivo	Alho A	Alho B	Alecrim A	Alecrim B		
Período 0-30 dias (P30)							
Consumo (kg MS/dia)	1,06	1,10	1,08	0,99	1,12	0,310	21,84
GMD (kg/dia)	0,198	0,195	0,177	0,167	0,188	0,540	20,87
CA	5,88	5,70	6,40	6,08	6,46	0,680	18,52
EA	0,183	0,186	0,161	0,171	0,158	0,370	19,68
Período 31-60 dias (P60)							
Consumo (kg MS/dia)	1,07ab	1,13ab	1,05b	0,96b	1,22a	0,002	19,06
GMD (kg/dia)	0,139b	0,139b	0,177b	0,167b	0,233a	0,0006	23,53
CA	8,94b	6,66ab	6,41ab	7,35ab	5,96a	0,023	28,03
EA	0,131	0,159	0,161	0,149	0,175	0,196	23,26
Período 61-90 dias (P90)							
Consumo (kg MS/dia)	0,96b	1,11ab	1,05b	0,99b	1,30a	0,001	20,80
GMD (kg/dia)	0,127b	0,152ab	0,143b	0,120b	0,193a	0,002	22,53
CA	10,34	7,70	8,25	8,12	7,53	0,196	29,90
EA	0,128	0,132	0,134	0,132	0,141	0,969	24,64

765 GMD: ganho médio diário; CA: conversão alimentar; EA: eficiência alimentar. P: probabilidade;
 766 CV: coeficiente de variação. Sem aditivo: sem adição de óleos essenciais; Alho A: 1,00 mL/L
 767 de líquido ruminal; Alho B: 0,14 mL/L; Alecrim A: 1,00 mL/L; Alecrim B: 0,40 mL/L. Valores
 768 seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

769 Esse mesmo padrão se repetiu no período final (P90), em que os cordeiros
 770 alimentados com a dieta Alecrim (B) mantiveram o maior GMD (0,193 kg/dia),
 771 significativamente superior ao grupo controle (0,127 kg/dia) ($P = 0,002$). As dietas
 772 contendo alho, nas duas dosagens, novamente apresentaram desempenhos
 773 intermediários.

Além do GMD, observou-se efeito significativo da dieta sobre o CMS nos períodos P60 ($P = 0,002$) e P90 ($P = 0,001$), com maior consumo registrado na dieta Alecrim (B) em ambos os períodos. A CA também foi influenciada pelas dietas no P60 ($P = 0,023$), sendo mais baixa na dieta Alecrim (B) (5,96), indicando melhor aproveitamento do alimento ingerido para ganho de peso. No entanto, embora essa dieta tenha promovido maior desempenho e melhor conversão, a EA, que expressa diretamente a quantidade de ganho por unidade de matéria seca consumida, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos em nenhum dos períodos avaliados ($P > 0,05$).

O melhor desempenho dos cordeiros alimentados com a dieta Alecrim (B), em comparação à dieta Alecrim (A), pode estar associado a um efeito dose-dependente dos compostos bioativos presentes no óleo essencial de alecrim. Em estudos anteriores, Cavalheiro Junior et al. (2021) observaram que o óleo essencial de alecrim influenciou de maneira quadrática a degradação de carboidratos no rúmen, sendo a dosagem de 0,71 g/L a mais eficiente para a produção de gases oriundos da degradação de carboidratos não fibrosos, enquanto concentrações maiores resultaram em redução da atividade fermentativa. Essa resposta pode ser explicada pela ação antimicrobiana dos terpenoides do alecrim, como o 1,8-cineol, o α -pineno e o borneol, que em concentrações elevadas podem inibir não apenas microrganismos patogênicos, mas também microrganismos benéficos do rúmen, afetando negativamente a fermentação e a digestibilidade dos nutrientes (Dorantes-Iturbide et al., 2022; Rabee et al., 2025).

Além disso, Cobellis et al. (2016) demonstraram que o óleo essencial de alecrim, quando fornecido a ovelhas, promoveu alterações na microbiota ruminal, incluindo o aumento de bactérias fibrolíticas como *Fibrobacter succinogenes* e a redução de populações arqueanas metanogênicas, o que pode estar relacionado a uma maior eficiência na utilização da energia da dieta. Essa modulação microbiana, contudo, é altamente sensível à dose administrada: dosagens mais elevadas podem comprometer o crescimento de populações celulolíticas, reduzindo a digestibilidade da fibra e o desempenho animal.

Do ponto de vista farmacológico, é importante considerar que os compostos fenólicos do alecrim apresentam ação antimicrobiana por mecanismos como

desestabilização da membrana celular microbiana e inibição de enzimas intracelulares (Dorantes-Iturbide et al., 2022; Rabee et al., 2025). Quando fornecidos em concentrações excessivas, esses compostos podem desencadear um efeito supressor da fermentação ruminal como um todo, comprometendo a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e, conseqüentemente, o ganho de peso dos animais. Esse fenômeno corrobora a hipótese de que a menor dosagem testada neste estudo (Alecrim B) ofereceu um equilíbrio mais favorável entre modulação da microbiota e preservação da atividade fermentativa.

A suplementação com óleo essencial de alho, independentemente da dosagem, não apresentou alterações estatísticas entre suas concentrações. Embora alguns estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando ovinos e bovinos demonstrem que o uso de óleos essenciais de alho melhora a digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes (Barreto-Cruz et al., 2023) e também a CA (Yang et al., 2007). Evidenciando ainda mais a necessidade de maiores estudos *in vivo*, para que possamos chegar a uma dosagem realmente eficaz.

A suplementação com óleo essencial de alho e alecrim influenciou significativamente algumas características de carcaça dos cordeiros confinados (Tabela 4). O peso vivo final (PVF) apresentou efeitos estatisticamente distintos ($P = 0,0004$), com os animais do grupo Alecrim (B) atingindo o maior valor médio (45,16 kg), diferindo das dietas sem aditivo, Alho (B) e Alecrim (A), cujos valores variaram de 38,27 a 39,81 kg, respectivamente. A dieta Alho (A) (41,69 kg), não apresentou diferença significativa em relação às demais.

Comportamento semelhante foi observado para o peso da carcaça quente (PCQ) e o peso da carcaça fria (PCF), ambos com efeitos estatisticamente distintos ($P = 0,002$). O maior valor para PCQ foi registrado na dieta Alecrim (B) (22,10 kg), enquanto Alecrim (A) apresentou o menor valor (18,63 kg). O mesmo padrão se repetiu para PCF, variando de 17,83 kg (Alecrim A) a 21,10 kg (Alecrim B), indicando que a menor dosagem do óleo essencial de alecrim favoreceu a deposição de tecidos.

Por outro lado, os rendimentos de carcaça quente (RCQ) e fria (RCF) não foram afetados significativamente pelas dietas ($P = 0,766$ e $P = 0,679$, respectivamente), com valores médios entre 48,03% e 49,29% para RCQ e entre 45,57% e 46,97% para

RCF. A ausência de diferença significativa indica que, embora os pesos absolutos das carcaças tenham sido impactados pela suplementação, a proporção de aproveitamento da carcaça em relação ao peso vivo permaneceu estável entre as dietas.

Tabela 3 - Características de carcaça de confinados, alimentados com rações contendo diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim.

Características	Dietas					P	CV (%)
	Sem Aditivo	Alho A	Alho B	Alecrim A	Alecrim B		
PVI (kg)	26,39	26,30	25,90	25,99	27,24	0,996	24,94
PVF (kg)	38,73 b	41,69 ab	39,81 b	38,27 b	45,16 a	0,0004	18,20
PCQ (kg)	19,09 b	20,21 ab	19,26 b	18,63 b	22,1 a	0,002	20,58
PCF (kg)	18,21 b	19,34 ab	18,31 b	17,83 b	21,1 a	0,002	21,26
RCQ (%)	49,29	48,21	48,03	48,66	48,79	0,766	4,42
RCF (%)	46,97	46,11	45,57	46,51	46,58	0,679	4,88
PPR (%)	4,7	4,36	5,19	4,44	4,54	0,492	25,56

PVI: peso vivo inicial; PVF: peso vivo final; PCQ: peso de carcaça quente; PCF: peso de carcaça fria; RCQ: rendimento de carcaça quente; RCF: rendimento de carcaça fria; PPR: perda por resfriamento. P: probabilidade; CV: coeficiente de variação. Sem aditivo: sem adição de óleos essenciais; Alho A: 1,00 mL/L de líquido ruminal; Alho B: 0,14 mL/L; Alecrim A: 1,00 mL/L; Alecrim B: 0,40 mL/L. Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A perda por resfriamento (PPR), apesar de apresentar variação numérica entre as dietas, não foi influenciada significativamente ($P = 0,492$). Os valores oscilaram entre 4,36% (Alho A) e 5,19% (Alho B), com coeficiente de variação elevado (25,56%), o que pode indicar variabilidade individual entre os animais, não necessariamente relacionada à dieta.

Os resultados na literatura sobre as características de carcaça em função do uso de óleos essenciais na dieta ainda são escassos, principalmente em ovinos. Entretanto Cruz et al., (2014) avaliaram os efeitos da substituição do milho por glicerina e a adição de óleos essenciais de *Anacardium occidentale* e *Ricinus communis* sobre o desempenho, eficiência alimentar e características de carcaça de 27 novilhos mestiços ($\frac{1}{2}$ Angus x $\frac{1}{2}$ nelore) terminados em confinamento. Os autores concluíram que não houve efeito das dietas no peso, rendimento, conformação e comprimento da carcaça.

A inclusão de óleos essenciais na dieta influenciou de maneira significativa os parâmetros de carcaça dos cordeiros confinados. Entre as dietas avaliadas, a

864 formulação com menor concentração de óleo essencial de alecrim (Alecrim B)
865 destacou-se por proporcionar os melhores desempenhos nas variáveis peso vivo final,
866 carcaça quente e carcaça fria, indicando um possível efeito positivo da modulação
867 microbiana associada a essa dosagem. Resultados semelhantes foram reportados por
868 Aouadi et al., (2014), que atribuíram o aumento no peso de carcaça de cordeiros
869 suplementados com óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* à maior estabilidade
870 oxidativa e à melhora na eficiência do metabolismo energético.

871 Por outro lado, Canbolat et al., (2021) ao testarem diferentes níveis de óleo
872 essencial de alho em cordeiros, não observaram efeitos sobre o peso corporal final,
873 mas relataram alterações em parâmetros ruminais e metabólicos, reforçando a
874 hipótese de que os efeitos dos óleos essenciais são dependentes da dose e do tipo
875 de composto bioativo presente. Essa dose-resposta foi reforçada por Chaves et al.,
876 (2008b), que observaram que suplementações com compostos naturais, como alho e
877 zimbros, podem afetar o desempenho e características de carcaça de maneira não
878 linear.

879 O aumento significativo nos pesos das carcaças sem alteração nos rendimentos
880 (RCQ e RCF) corrobora com os achados de Arteaga-Wences et al., (2021), que
881 destacaram que melhorias nos pesos absolutos da carcaça podem ocorrer sem
882 alteração na proporção relativa de aproveitamento, sendo os ganhos mais expressivos
883 atribuídos à maior deposição de tecidos. Além disso, os resultados obtidos estão em
884 linha com os achados de Soltan et al., (2018), que relataram que a adaptação
885 progressiva de ovinos a misturas de óleos essenciais permitiu ganhos na fermentação
886 ruminal sem afetar a eficiência produtiva, demonstrando a importância de equilíbrio
887 entre modulação da microbiota e manutenção da digestibilidade.

888 Assim, os dados reforçam a ideia de que a suplementação com óleos essenciais,
889 quando realizada em dosagens adequadas, pode promover melhorias no
890 desempenho zootécnico e nos parâmetros de carcaça, sendo o óleo de alecrim, na
891 menor dosagem testada, o mais promissor nesse contexto.

892 A suplementação com óleos essenciais influenciou significativamente apenas a
893 espessura de gordura ($P = 0,002$) no músculo *Longissimus lumborum* de cordeiros
894 confinados (Tabela 5). Os animais alimentados com a dieta Alecrim (B) apresentaram

maior deposição de gordura subcutânea (4,68 mm), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos, cujos valores variaram entre 3,26 mm (Alho A) e 3,52 mm (Alecrim A). A maior espessura de gordura observada nesse grupo pode estar relacionada ao melhor desempenho observado anteriormente, sugerindo um efeito potencial da menor dosagem de óleo de alecrim sobre o metabolismo lipídico. Esses valores estão alinhados com os encontrados por Mushi et al., (2009), que relataram espessuras de gordura entre 3,42 mm e 4,20 mm em pequenos ruminantes abatidos com pesos entre 30 e 45 kg.

Tabela 4- Parâmetros do músculo *Longissimus lumborum* de alimentados com rações contendo diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim.

Parâmetros da carne	Dietas					P	CV (%)
	Sem Aditivo	Alho A	Alho B	Alecrim A	Alecrim B		
Espessura de gordura (mm)	3,38 b	3,26 b	3,44 b	3,52 b	4,68 a	0,002	22,13
Largura do músculo (mm)	30,96	31,94	30,86	27,52	32,08	0,461	16,87
Profundidade de músculo (mm)	62,31	59,09	59,52	59,24	58,93	0,597	7,39
AOL (cm ²)	15,57	14,77	14,88	14,81	14,73	0,597	7,39
Oxidação Lipídica (mg TBA/kg)	0,15	0,17	0,16	0,17	0,16	0,847	15,84
pH	5,97	5,75	5,83	5,69	5,83	0,393	4,69
L* (luminosidade)	38,24	40,54	39,33	39,96	38,17	0,77	5,59
a* (componente verde-vermelho)	13,61	14,47	14,68	15,56	14,22	0,613	15,2
b* (componente azul-amarelo)	13,12	13,95	13,68	14,53	13,45	0,29	9,29
c* (croma)	18,92	20,13	20,11	21,3	19,59	0,467	11,81
h* (°) (tonalidade)	45,93	45,77	46,63	46,9	46,35	0,945	6,14

AOL: área de olho de lombo; pH: potencial hidrogeniônico; L*, a*, b*: componentes do sistema de cor CIELAB (luminosidade, verde-vermelho e azul-amarelo, respectivamente); c*: croma; h*: tonalidade (hue angle). P: probabilidade; CV: coeficiente de variação. Sem aditivo: sem adição de óleos essenciais; Alho A: 1,00 mL/L de líquido ruminal; Alho B: 0,14 mL/L; Alecrim A: 1,00 mL/L; Alecrim B: 0,40 mL/L. Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação às dimensões musculares, não houve efeitos estatisticamente distintos para largura ($P = 0,461$), profundidade ($P = 0,597$) e área de olho de lombo ($P = 0,597$). Os valores médios variaram de 27,52 mm a 32,08 mm para largura, de 58,93 mm a 62,31 mm para profundidade e de 14,73 cm² a 15,57 cm² para a AOL, estando dentro da faixa esperada para cordeiros de genótipo cruzado em

confinamento. Estudos como o de Fernandes et al., (2022) também observaram áreas de olho de lombo variando entre 12,19 cm² e 17,21 cm², dependendo do sistema de terminação adotado.

A oxidação lipídica, segundo o índice TBARS, não foi influenciada pelas dietas (P = 0,847), com valores variando de 0,15 a 0,17 mg TBA/kg, indicando estabilidade oxidativa semelhante entre os grupos. Da mesma forma, o pH final da carne variou entre 5,69 e 5,97 (P = 0,393), o que demonstra que o estado fisiológico dos animais no pré-abate não foi afetado pelo uso dos óleos essenciais. Esses valores estão dentro da faixa considerada normal para carne ovina, que varia de 5,5 a 5,8, conforme relatado por Shija et al., (2013).

Quanto à coloração da carne, os parâmetros L* (luminosidade), a* (componente verde-vermelho), b* (componente azul-amarelo), c* (croma) e h* (tonalidade) também não apresentaram efeitos estatisticamente distintos (P > 0,05), com valores dentro dos padrões normalmente observados para cordeiros abatidos jovens. Esses resultados sugerem que a inclusão de óleos essenciais de alho e alecrim, nas dosagens utilizadas, não comprometeu a qualidade visual ou tecnológica da carne produzida.

Rivaroli et al., (2016) avaliaram os efeitos de uma mistura de óleos essenciais, incluindo alecrim e alho, na qualidade da carne de novilhos mestiços e encontraram que os óleos essenciais não tiveram efeito na composição química e de ácidos graxos, cor da carne, capacidade de retenção de água ou textura, mas uma inclusão de 3,5 g/dia diminuiu a oxidação lipídica. Cetin et al., (2023) sugeriram que a adição de óleos essenciais de alecrim às rações de cordeiro é mais eficaz nos parâmetros antioxidantes do que nos parâmetros de desempenho e pode ser usada como um produto antioxidante natural. Esses resultados divergem com os encontrados no presente estudo em relação à oxidação lipídica, evidenciando ainda mais a necessidade de mais estudos em relação as quais dosagens são mais eficazes para a produção de ruminantes.

CONCLUSÃO

A suplementação com óleo essencial de alecrim em menor dosagem (Alecrim B) favoreceu o desempenho dos cordeiros nos períodos intermediário e final do

confinamento, resultando em maiores pesos finais e carcaças mais pesadas. As características de carcaça e qualidade da carne não foram alteradas entre os tratamentos. Dessa forma, recomenda-se a utilização contínua do óleo essencial de alecrim na dosagem mínima durante todo o período de confinamento como estratégia nutricional para otimizar o desempenho produtivo e a eficiência alimentar de cordeiros confinados.

REFERÊNCIAS

ALAO, Babatunde O. *et al.* The potential of animal by-products in food systems: Production, prospects and challenges. **Sustainability (Switzerland)**MDPI, , 22 jun. 2017.

ANDRI, Faizal; HUDA, Asri Nurul; MARJUKI, Marjuki. The use of essential oils as a growth promoter for small ruminants: A systematic review and meta-analysis. **F1000Research**F1000 Research Ltd, , 1 jun. 2020.

AOUADI, Dorra *et al.* The antioxidant status and oxidative stability of muscle from lambs receiving oral administration of *Artemisia herba alba* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Meat Science**, v. 97, n. 2, p. 237–243, 1 jun. 2014.

ARTEAGA-WENCES, Y. J. *et al.* The effects of feeding a standardized mixture of essential oils vs monensin on growth performance, dietary energy and carcass characteristics of lambs fed a high-energy finishing diet. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106557, 1 dez. 2021.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17. ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18. ed. Gaithersburg, MD: AOAC International, 2006.

BARRETO-CRUZ, Olga Teresa *et al.* Assessing the In Vitro and In Vivo Effect of Supplementation with a Garlic (*Allium sativum*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oil Mixture on Digestibility in West African Sheep. **Veterinary Sciences**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2023.

BETTENCOURT, Arthur Fernandes *et al.* Sistemas de produção para terminação de cordeiros no Sul do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 26, n. 1, p. 243–262, 8 set. 2020.

CAMPOLINA, Joana Palhares *et al.* Effects of a blend of essential oils in milk replacer on performance, rumen fermentation, blood parameters, and health scores of dairy heifers. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3 March, 1 mar. 2021.

- 982 CANBOLAT, Onder *et al.* Effect of garlic oil on lamb fattening performance, Rumen
983 fermentation and blood parameters. **Progress in Nutrition**, v. 23, n. 1, 1 abr. 2021.
- 984 CAVALHEIRO JUNIOR, Elias Rodrigues *et al.* Effect of Supplying Rosemary
985 (*Rosmarinus officinalis* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) Essential Oils to Feedlot
986 Lambs on in vitro Ruminant Fermentation. **Frontiers in Animal Science**, v. 2, 2021.
- 987 CETIN, I. *et al.* The effects of rosemary essential oil supplementation on growth
988 performance, rumen flora and antioxidant blood parameters in growing Merino lambs.
989 **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 74, n. 4, p. 6607–6614, 2023.
- 990 CEZAR, M. F.; SOUZA, W. H. **Carcaças ovinas e caprinas: obtenção, avaliação e**
991 **classificação**. Uberaba, MG: Agropecuária Tropical, 2007.
- 992 CHAVES, A. V. *et al.* Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils
993 on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass
994 characteristics of growing lambs. **Livestock Science**, v. 117, n. 2–3, p. 215–224, 1
995 set. 2008.
- 996 COBELLIS, G. *et al.* Use of *Rosmarinus officinalis* in sheep diet formulations: Effects
997 on ruminal fermentation, microbial numbers and in situ degradability. **Small Ruminant**
998 **Research**, v. 126, n. S1, p. 10–18, 1 maio 2015.
- 999 CRUZ, Olga Teresa Barreto *et al.* Effect of glycerine and essential oils (*anacardium*
1000 *occidentale* and *ricinus communis*) on animal performance, feed efficiency and carcass
1001 characteristics of crossbred bulls finished in a feedlot system. **Italian Journal of**
1002 **Animal Science**, v. 13, n. 4, p. 790–797, 24 nov. 2014.
- 1003 DETMANN, E. *et al.* **Métodos para análise de alimentos**. 1. ed. Visconde do Rio
1004 Branco, MG: Suprema, 2012.
- 1005 DORANTES-ITURBIDE, Griselda *et al.* Essential Oils as a Dietary Additive for Small
1006 Ruminants: A Meta-Analysis on Performance, Rumen Parameters, Serum Metabolites,
1007 and Product Quality. **Veterinary Sciences** MDPI, , 1 set. 2022.
- 1008 FERNANDES, Sergio Rodrigo *et al.* Weaning and concentrate supplementation on the
1009 characteristics of carcass cuts and longissimus muscle of Suffolk lambs finished on
1010 pasture. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 44, 22 dez. 2022.
- 1011 IOMMELLI, Piera *et al.* Functional and Economic Role of Some Mediterranean
1012 Medicinal Plants in Dairy Ruminants' Feeding: A Review of the Effects of Garlic,
1013 Oregano, and Rosemary. **Animals** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI),
1014 , 1 mar. 2025.
- 1015 MUSHI, D. E. *et al.* Effects of concentrate levels on fattening performance, carcass
1016 and meat quality attributes of Small East African × Norwegian crossbred goats fed low
1017 quality grass hay. **Livestock Science**, v. 124, n. 1–3, p. 148–155, 1 set. 2009.
- 1018 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**.
1019 New York: National Academy of Sciences, 2007.
- 1020 OSÓRIO, José Carlos da Silveira; OSÓRIO, Maria Teresa Moreira. **Produção de**

- 1021 **carne ovina: técnicas de avaliação “in vivo” e na carcaça**. 2. ed. Pelotas, RS:
1022 Editora Universitária da UFPEL, 2005.
- 1023 PIKUL, Jan; LESZCZYNSKI, Dennis E.; KUMMEROW, Fred A. Evaluation of three
1024 modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. **Journal of**
1025 **Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1309–1313, 1 set. 1989.
- 1026 RABEE, Alaa Emara *et al.* Effect of garlic powder supplementation on rumen
1027 microbiota and histology, and blood metabolites in Barki lambs. **BMC Veterinary**
1028 **Research**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2025.
- 1029 RIVAROLI, Dayane Cristina *et al.* Effect of essential oils on meat and fat qualities of
1030 crossbred young bulls finished in feedlots. **Meat Science**, v. 121, p. 278–284, 1 nov.
1031 2016.
- 1032 SHIJA, Dismas S. *et al.* Chemical composition and meat quality attributes of
1033 indigenous sheep and goats from traditional production system in Tanzania. **Asian-**
1034 **Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 295–302, fev. 2013.
- 1035 SOLTAN, Y. A. *et al.* Progressive adaptation of sheep to a microencapsulated blend
1036 of essential oils: Ruminal fermentation, methane emission, nutrient digestibility, and
1037 microbial protein synthesis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 237, p. 8–18,
1038 1 mar. 2018.
- 1039 UNIÃO EUROPEIA. **Regulamento (CE) n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do**
1040 **Conselho, de 22 de setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à**
1041 **alimentação animal** **Jornal Oficial da União Europeia**. Bruxelas, União Europeia:
1042 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831>, 22 set.
1043 2003. Disponível em: <[https://eur-lex.europa.eu/legal-](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831)
1044 [content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX:32003R1831)>. Acesso em: 9 ago. 2024.
- 1045 YANG, W. Z. *et al.* Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal
1046 fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. **Journal of Dairy**
1047 **Science**, v. 90, n. 12, p. 5671–5681, 2007.
- 1048 ZHANG, Ben *et al.* Effects of High-Concentrate Diets on Growth Performance, Serum
1049 Biochemical Indexes, and Rumen Microbiota in House-Fed Yaks. **Animals**, v. 14, n.
1050 24, 1 dez. 2024.
- 1051 ZHONG, Rongzhen *et al.* Effects of feeding garlic powder on growth performance,
1052 rumen fermentation, and the health status of lambs infected by gastrointestinal
1053 nematodes. **Animals**, v. 9, n. 3, 1 mar. 2019.

1054 **7 ARTIGO 2** - Óleos essenciais de alho (*Allium sativum* L.) e alecrim (*Rosmarinus*
1055 *officinalis* L.) na diversidade microbiota ruminal de cordeiros confinados

1056 RESUMO

1057 Objetivou-se caracterizar a microbiota ruminal de cordeiros confinados e alimentados
1058 com dietas contendo óleos essenciais de alho e alecrim, por meio do sequenciamento
1059 da região V3–V4 do gene 16S rRNA. Foram utilizados 35 cordeiros machos, mestiços
1060 das raças Texel × Dorper × Santa Inês, com peso inicial médio de $26,3 \pm 6,2$ kg,
1061 distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com cinco dietas
1062 experimentais (sete repetições cada): sem aditivo, Alho A (1,00 mL/L de líquido
1063 ruminal), Alho B (0,14 mL/L), Alecrim A (1,00 mL/L) e Alecrim B (0,40 mL/L). Os
1064 animais permaneceram confinados por 90 dias e receberam dieta composta por 30%
1065 de silagem de milho e 70% de concentrado à base de milho moído e farelo de soja.
1066 Amostras de líquido ruminal (0,9 mL) de três animais por dieta foram submetidas à
1067 metagenômica. A diversidade alfa (índices de Shannon, Simpson e Chao) não diferiu
1068 entre as dietas ($p > 0,05$). A análise taxonômica revelou que *Prevotella* foi o gênero
1069 dominante, especialmente na dieta sem aditivo, sendo reduzido nas dietas com óleos
1070 essenciais. A dieta Alecrim B favoreceu a população de *Fibrobacter*, indicando
1071 manutenção da atividade celulolítica. Em contrapartida, a maior abundância de
1072 arqueas metanogênicas (*Methanobrevibacter* e *Methanomassiliicoccus*) foi observada
1073 nesta mesma dieta, embora com relação metanogênicos/celulolíticos mais favorável
1074 em comparação às demais. Esses resultados indicam que o uso de óleos essenciais
1075 modulou seletivamente a microbiota ruminal, sendo que a menor dosagem de alecrim
1076 apresentou melhor equilíbrio entre fermentação eficiente. Portanto, os óleos
1077 essenciais de alho e alecrim representam alternativas viáveis para otimizar a
1078 fermentação ruminal e a eficiência alimentar em sistemas intensivos de produção de
1079 cordeiros.

1080 **Palavras- chaves:** fermentação ruminal, microbiota ruminal, sequenciamento 16S
1081 rRNA

1082 ABSTRACT

1083 This study aimed to characterize the rumen microbiota of confined lambs fed diets
1084 containing essential oils (EOs) of garlic and rosemary, using sequencing of the V3–V4
1085 region of the 16S rRNA gene. Thirty-five non-castrated male lambs, Texel × Dorper ×
1086 Santa Inês crossbreeds, with an average initial weight of 26.3 ± 6.2 kg, were assigned
1087 to a completely randomized design with five experimental diets (seven replicates
1088 each): no additive, Garlic A (1.00 mL/L of ruminal fluid), Garlic B (0.14 mL/L),
1089 Rosemary A (1.00 mL/L), and Rosemary B (0.40 mL/L). The animals were confined for
1090 90 days and received a diet composed of 30% corn silage and 70% concentrate based
1091 on ground corn and soybean meal. Ruminal fluid samples (0.9 mL) from three animals
1092 per diet were submitted for metagenomic analysis. Alpha diversity (Shannon, Simpson,
1093 and Chao indices) did not differ among diets ($p > 0.05$). Taxonomic analysis revealed
1094 that *Prevotella* was the dominant genus, especially in the control diet, and was reduced
1095 in the EO-supplemented diets. The Rosemary B diet favored the population of
1096 *Fibrobacter*, indicating preserved cellulolytic activity. Conversely, a higher abundance
1097 of methanogenic archaea (*Methanobrevibacter* and *Methanomassiliicoccus*) was
1098 observed in the same diet, although with a more favorable methanogen/cellulolytic
1099 ratio compared to the other treatments. These findings suggest that essential oils

1100 selectively modulated the rumen microbiota, with the lower rosemary dosage providing
1101 a better balance for efficient fermentation. Therefore, garlic and rosemary essential oils
1102 represent viable alternatives to optimize ruminal fermentation and feed efficiency in
1103 intensive lamb production systems.

1104 **Keywords:** ruminal fermentation, genomics, 16S rRNA sequencing

1105 INTRODUÇÃO

1106 A microbiota ruminal desempenha um papel essencial na digestão de compostos
1107 dietéticos complexos em ruminantes. Esse ecossistema diversificado, formado
1108 principalmente por bactérias, protozoários, fungos e arqueas, atua na fermentação de
1109 carboidratos, proteínas e lipídios, fornecendo nutrientes essenciais ao animal
1110 hospedeiro. O processo fermentativo resulta na produção de ácidos graxos de cadeia
1111 curta (AGCCs), amônia e metano, embora apresente perdas energéticas,
1112 especialmente sob a forma de metano (Castillo-González et al., 2014). A composição
1113 e proporção entre carboidratos fibrosos e não fibrosos das dietas afetam diretamente
1114 a composição e atividade da microbiota ruminal, influenciando a estabilidade do pH e
1115 o perfil fermentativo (Oliveira et al., 2016).

1116 A introdução de ferramentas ômicas, como a metagenômica, revolucionou o
1117 estudo da microbiota do rúmen, permitindo caracterizar comunidades microbianas
1118 antes desconhecidas e revelar sua contribuição funcional para o metabolismo do
1119 hospedeiro (Delgadillo-Ruiz et al., 2021). Tais avanços permitem correlacionar a
1120 diversidade microbiana com indicadores de desempenho produtivo, eficiência
1121 alimentar e impacto ambiental da produção animal.

1122 A utilização de aditivos de origem vegetal na alimentação de ruminantes tem se
1123 mostrado uma estratégia promissora para modular a microbiota ruminal de forma
1124 seletiva e funcional. Óleos essenciais extraídos de plantas como o alho (*Allium*
1125 *sativum*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) destacam-se por suas propriedades
1126 antimicrobianas, antioxidantes e pela capacidade de influenciar a fermentação
1127 microbiana no rúmen (Iommelli et al., 2025). Estudos demonstram que esses
1128 compostos bioativos podem inibir populações microbianas indesejáveis e favorecer
1129 gêneros fermentadores benéficos, como aqueles envolvidos na produção de ácidos
1130 graxos de cadeia curta. Além disso, há evidências de que os óleos essenciais são
1131 capazes de reduzir a produção de metano entérico, melhorar a eficiência alimentar e

1132 modular o metabolismo nitrogenado no rúmen (Chaves et al., 2008a; Sha et al., 2024).
1133 Esses compostos podem alterar significativamente a abundância relativa de gêneros
1134 microbianos envolvidos na produção de AGCCs e na degradação do substrato
1135 fermentável, melhorando potencialmente a eficiência alimentar ou reduzindo as
1136 emissões de metano entérico (Delgadillo-Ruiz et al., 2021).

1137 Diante disso, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a microbiota
1138 ruminal de ovinos confinados e alimentados com rações contendo óleo essencial de
1139 alho e alecrim.

1140 MATERIAL E MÉTODOS

1141 O experimento foi conduzido na Fazenda Escola (FAZESC) do Departamento de
1142 Zootecnia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), localizada no estado do
1143 Paraná, Brasil, com aprovação prévia do Comitê de Ética no Uso de Animais
1144 (CEUA/UEL), sob o protocolo nº 035.2022.

1145 Foram utilizados 35 cordeiros machos, não castrados, mestiços das raças Texel
1146 × Dorper × Santa Inês, com peso vivo inicial médio de $26,3 \pm 6,20$ kg e idade
1147 aproximada de 90 dias. Os animais foram identificados e alojados individualmente em
1148 baias com piso ripado, equipadas com comedouros e bebedouros, sendo mantidos
1149 em regime de confinamento por 90 dias, precedidos por 15 dias de adaptação.

1150 As pesagens foram realizadas no início do experimento e a cada 15 dias,
1151 precedendo a primeira alimentação do dia, para avaliação do desempenho e ajustes
1152 na dieta. As dietas experimentais foram formuladas para serem isoprotéicas e
1153 isoenergéticas, com base em silagem de milho (30%) e concentrado (70%) composto
1154 por farelo de soja, milho moído, fosfato bicálcico, calcário, óleo de soja e bicarbonato
1155 de sódio (Tabela 1). O balanceamento nutricional seguiu as recomendações do NRC,
1156 (2007), visando ganho de peso de 250 g/dia.

1157 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco dietas e
1158 sete repetições por dieta. As dietas diferiram apenas na inclusão de óleos essenciais
1159 de alho e alecrim. A dieta 1, denominada sem aditivo, não continha inclusão de óleos
1160 essenciais. A dieta 2, denominada Alho A, continha 1,00 mL de óleo essencial de alho

1161 por litro de líquido ruminal (mL/L). A dieta 3, Alho B, continha 0,14 mL/L de óleo
 1162 essencial de alho. A dieta 4, Alecrim A, incluía 1,00 mL/L de óleo essencial de alecrim.
 1163 Por fim, a dieta 5, Alecrim B, incluía 0,40 mL/L de óleo essencial de alecrim.

1164 **Tabela 1:** Composição química dos alimentos, proporção dos ingredientes na dieta e
 1165 composição química da dieta base utilizados na ração fornecida para cordeiros
 1166 confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alecrim ou
 1167 alho

Composição química dos alimentos base (% da MS)			
	Silagem de milho	Milho moído	Farelo de soja
Matéria seca (% na MN)	27,66	90,95	93,39
Proteína bruta	8,10	10,45	52,76
Extrato etéreo	2,40	3,89	1,67
Matéria orgânica	96,12	98,54	93,11
Fibra em detergente neutro	49,43	11,11	10,03
Fibra em detergente ácido	22,65	1,93	4,00
Hemicelulose	26,78	9,19	6,04
Carboidratos totais	85,62	84,20	38,68
Proporção dos ingredientes na dieta base (%)			
Silagem de milho	30,00		
Milho moído	39,22		
Farelo de soja	27,96		
Fosfato bicálcico	0,31		
Calcário	1,01		
Bicarbonato de sódio	0,50		
Óleo de soja	1,00		
Óleo essencial de alecrim ^{ab}	*		
Óleo essencial de alho ^{xy}	*		
Total	100.00		
Composição química da dieta base (% da MS)			
Matéria seca (% na MN)	70,08		
Proteína bruta	21,28		
Extrato etéreo	2,71		
Matéria orgânica	93,52		
Fibra em detergente neutro	21,99		
Fibra em detergente ácido	8,67		
Hemicelulose	13,32		
Carboidratos totais	69,52		

1168 MS: matéria seca; MN: matéria natural; a: 0,40 mL/L de líquido ruminal; b: 1,00 mL/L ; x: 0,14
 1169 mL/L; y: 1,00 mL/L.

1170 Os óleos essenciais foram adquiridos de empresas comerciais, diluídos em óleo

1171 de soja e incorporados ao concentrado, com base nas recomendações de Cavalheiro
1172 Junior et al., (2021). O óleo de soja, além de compor a formulação da dieta, também
1173 foi utilizado como veículo para a incorporação dos óleos essenciais em cada dieta.

1174 A parte concentrada da dieta foi preparada separadamente para cada dieta
1175 experimental. A ordem de fabricação seguiu uma sequência rigorosa: inicialmente foi
1176 preparada a dieta sem adição de óleo essencial; em seguida, a dieta com menor
1177 concentração do respectivo óleo essencial e, por fim, a dieta com maior concentração.
1178 Ao realizar a troca entre os tipos de óleo essencial (de alho para alecrim ou vice-
1179 versa), uma quantidade de milho foi passada pelo misturador com o objetivo de evitar
1180 a contaminação cruzada entre os compostos. Este milho intermediário não foi utilizado
1181 nas rações experimentais, sendo destinado ao uso comum da fazenda.

1182 Os animais foram alimentados ad libitum, duas vezes ao dia (às 08h00 e às
1183 16h00). Para estimativa do consumo, diariamente foram realizadas pesagens da dieta
1184 total fornecida (volumoso e concentrado) e das sobras individuais. A quantidade de
1185 ração ofertada era ajustada com base no consumo de matéria seca do dia anterior,
1186 visando manter um percentual de sobras entre 5 e 10% da matéria natural fornecida,
1187 a fim de evitar restrição alimentar e assegurar ingestão adequada. Ajustes eram
1188 realizados sempre que o valor de sobras estivesse fora desse intervalo por dois dias
1189 consecutivos.

1190 Ao atingirem peso vivo médio de 40 kg, os animais foram transportados por
1191 aproximadamente 50 km até um frigorífico sob inspeção municipal. O abate seguiu
1192 normas de bem-estar animal, com insensibilização por eletronarcose, seguida de
1193 sangria, esfolagem e evisceração.

1194 Durante o abate, foram coletadas amostras de líquido ruminal de três animais
1195 selecionados aleatoriamente por dieta. De cada animal, foram coletados três tubos
1196 tipo microtubo (Eppendorf) contendo 0,9 mL de líquido ruminal cada, totalizando 2,7
1197 mL por animal. As amostras foram obtidas após filtração do conteúdo ruminal com
1198 auxílio de tecido tipo gaze em três camadas, com o objetivo de separar o líquido da
1199 fração sólida. Imediatamente após a coleta, o líquido ruminal foi acondicionado em
1200 gelo seco (aproximadamente -20°C) e transportado até o laboratório, onde foi
1201 armazenado a -80°C até o momento da extração.

A análise da microbiota foi realizada com base nas amostras de líquido ruminal enviadas à empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba, SP). O sequenciamento foi realizado na plataforma Illumina MiSeq (biblioteca paired-end), utilizando kit V3 com 600 ciclos (2×300 bp), com bibliotecas indexadas em duas etapas de PCR. Os primers utilizados foram 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT), direcionados à região V3-V4 do gene 16S rRNA, conforme descrito por (Wang; Qian, 2009). O preparo das bibliotecas seguiu protocolo da Neoprosecta Microbiome Technologies.

As sequências foram primeiramente avaliadas quanto à qualidade, com remoção de pares de bases ambíguos, homopolímeros superiores a oito pares, amplicons inespecíficos e redundantes. Em seguida, as leituras foram filtradas para exclusão de quimeras por meio do algoritmo VSEARCH. As sequências de boa qualidade foram alinhadas ao banco de dados SILVA e posteriormente agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com 97% de similaridade.

Após a formação das OTUs, foi realizada a normalização dos dados por meio de subamostragem (subsample) com base na amostra de menor profundidade de sequenciamento. A qualidade do sequenciamento e a representatividade da diversidade microbiana foram avaliadas por curvas de rarefação e índice de cobertura, com cobertura superior a 99%, assegurando alta representatividade da comunidade microbiana presente. O gráfico de rarefação encontra-se anexo a este manuscrito.

Em seguida, foram calculados os índices de diversidade alfa (Chao, Shannon, Simpson) e realizadas análises de diversidade beta, incluindo as distâncias Jaccard e ThetaYC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises metagenômicas geraram inicialmente um total de 496.214 contigs a partir dos dados brutos (raw reads). Após o tratamento dos dados, incluindo filtragem de qualidade e remoção de quimeras e sequências indesejadas, foram obtidas 365.106 sequências únicas, das quais 303.715 foram mantidas para as análises finais. Essas sequências permitiram a identificação e posterior análise da composição e diversidade da microbiota ruminal nas diferentes dietas experimentais.

Com base nessas sequências, foram identificadas 243 OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), utilizadas para compor o banco de dados taxonômico. A normalização do número de sequências por amostra foi realizada por subsampling. A curva de rarefação (anexo) demonstrou cobertura superior a 99,9% em todas as amostras, evidenciando uma alta representatividade da comunidade microbiana total.

As dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim não influenciaram significativamente os parâmetros de diversidade alfa da microbiota ruminal, incluindo o número médio de espécies observadas, a estimativa de riqueza de Chao e os índices de diversidade de Shannon e Simpson (Tabela 2; $P > 0,05$). O número de espécies observadas variou de $64,67 \pm 0,88$ na dieta Alho A a $72,33 \pm 5,78$ na dieta Sem aditivo. A maior estimativa de riqueza de Chao foi registrada na dieta Sem aditivo ($105,76 \pm 12,06$). Os índices de diversidade de Shannon e Simpson apresentaram variações entre as dietas, oscilando de 2,16 (Sem aditivo) a 2,41 (Alecrim B) e de 0,16 (Alecrim B) a 0,21 (Alho B), respectivamente.

Tabela 2. Número de espécies bacterianas observadas, estimativa de riqueza de Chao, e índices de diversidade de Shannon e Simpson A riqueza de ch(média $\pm$ erro padrão) da microbiota ruminal de cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim

	Dietas					P
	Sem Aditivo	Alho A	Alho B	Alecrim A	Alecrim B	
Nº Espécies observadas	70.33 $\pm$ 9.61	64.67 $\pm$ 0.88	66.67 $\pm$ 3.93	72.33 $\pm$ 5.78	67.00 $\pm$ 1.53	0.852
Chao	105.76 $\pm$ 12.06	79.09 $\pm$ 1.69	81.10 $\pm$ 5.65	98.71 $\pm$ 17.32	93.98 $\pm$ 10.70	0.408
Simpson	0.20 $\pm$ 0.02	0.20 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.02	0.16 $\pm$ 0.02	0.378
Shannon	2.16 $\pm$ 0.09	2.18 $\pm$ 0.02	2.25 $\pm$ 0.13	2.36 $\pm$ 0.14	2.41 $\pm$ 0.08	0.363

Sem aditivo = sem adição de óleos essenciais; Alho A = 1,00 mL/L de líquido ruminal de óleo essencial de alho; Alho B = 0,14 mL/L de óleo essencial de alho; Alecrim A = 1,00 mL/L de óleo essencial de alecrim; Alecrim B = 0,40 mL/L de óleo essencial de alecrim. P: probabilidade (nível de significância de 5%).

Foram identificados microrganismos pertencentes a 21 filos, 38 classes, 59 ordens, 60 famílias e 251 gêneros bacterianos. No nível de filo, *Bacteroidetes* foi o mais abundante em todas as dietas, com maior média na dieta Sem aditivo (15.011,0), seguido por *Firmicutes* (7.013,667) e *Proteobacteria* com maior média na dieta Alho A (6.015,333). Destacam-se também os filos *Fibrobacteres* e *Actinobacteria*, presentes em todas as dietas, ainda que em menores proporções.

No nível de classe, *Bacteroidia*, *Gammaproteobacteria* e *Negativicutes*

1261 dominaram a microbiota ruminal. A classe *Bacteroidia* apresentou a maior abundância
1262 média na dieta Sem aditivo (13.536,3), enquanto *Gammaproteobacteria* foi mais
1263 abundante na dieta Alho A (5.980,3).

1264 Quanto à ordem, *Bacteroidales*, *Selenomonadales* e *Clostridiales* foram
1265 predominantes. *Bacteroidales* foi a ordem mais abundante em todas as dietas, com
1266 destaque para a dieta Sem aditivo (13.536,3). A ordem *Selenomonadales* teve sua
1267 maior expressão também, na dieta Sem aditivo (4.756,3), refletindo a influência das
1268 dietas contendo óleos essenciais de alho e alecrim sobre bactérias fermentadoras
1269 importantes.

1270 A ordem *Bacteroidales* (Figura 1) foi a mais abundante em todas as dietas
1271 experimentais, com destaque para a dieta sem aditivo, que apresentou a maior média
1272 (13.536,33). Essa predominância sugere que a ausência de óleos essenciais favorece
1273 uma comunidade microbiana dominada por *Bacteroidales*. Membros dessa ordem,
1274 como o gênero *Prevotella*, são amplamente reconhecidos por sua capacidade de
1275 degradar polissacarídeos complexos e produzir ácidos graxos de cadeia curta
1276 (AGCCs), especialmente propionato, contribuindo para a eficiência energética da dieta
1277 basal (Stewart et al., 2018).

1278 A ordem *Selenomonadales*, associada à fermentação de açúcares e à produção
1279 de propionato e lactato, apresentou aumento expressivo em animais alimentados com
1280 Alecrim A (4.756,33), enquanto foi inferior nas dietas com Alho B (2.047,33) e Alecrim
1281 B (1.424,66). Esse padrão pode indicar que o óleo essencial de alecrim em alta dose
1282 estimula a fermentação de carboidratos solúveis, promovendo a proliferação de
1283 bactérias como *Selenomonas ruminantium*, conhecidas por converter lactato em
1284 propionato (Denman; Morgavi; McSweeney, 2018).

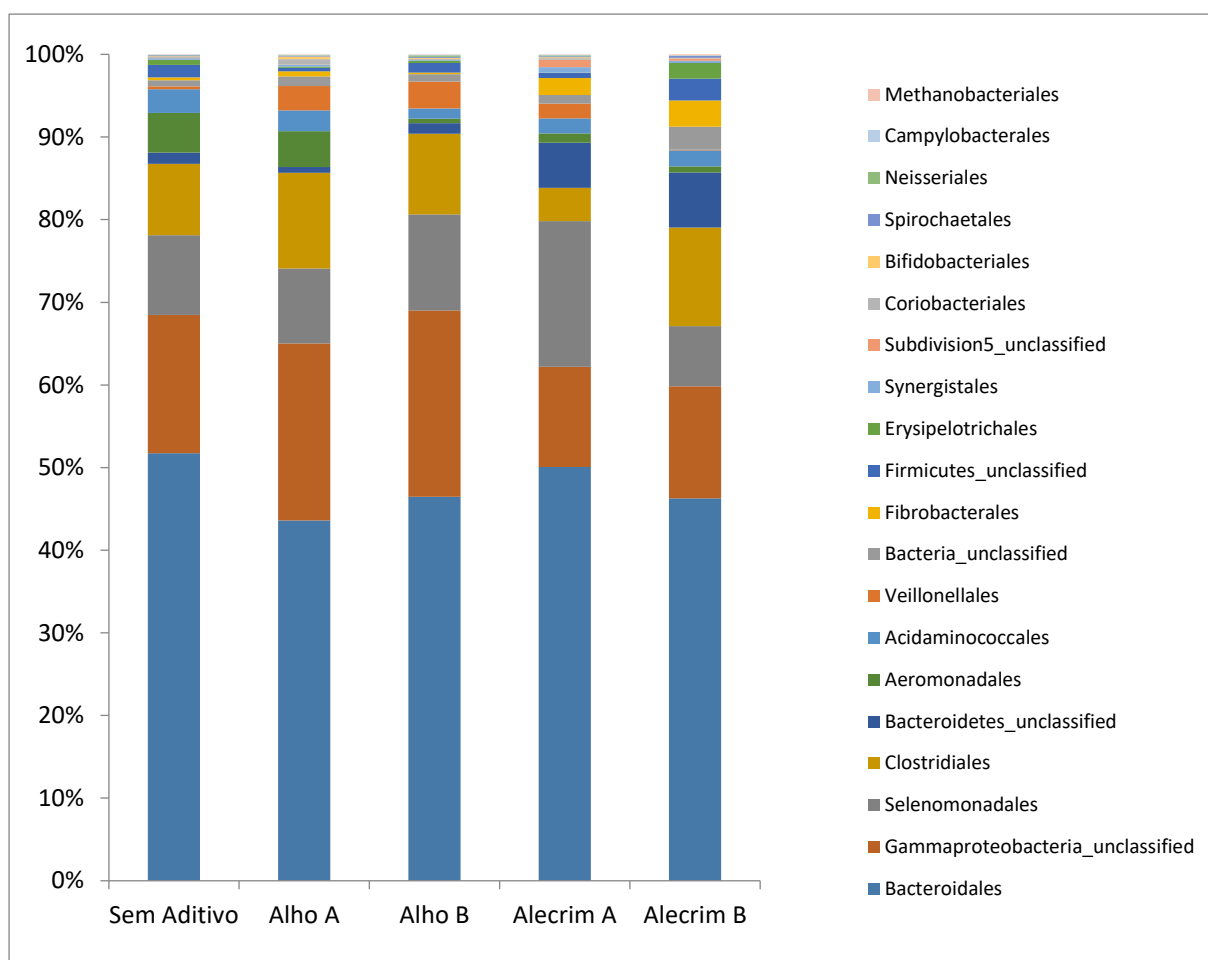


Figura 1. Distribuição relativa das principais ordens bacterianas da microbiota ruminal de cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim. As colunas representam a composição média das ordens bacterianas nos animais alimentados com as seguintes dietas: Sem aditivo (dieta controle, sem inclusão de óleos essenciais), Alho A (dieta com 1,00 mL/L de líquido ruminal de óleo essencial de alho), Alho B (0,14 mL/L de óleo essencial de alho), Alecrim A (1,00 mL/L de óleo essencial de alecrim) e Alecrim B (0,40 mL/L de óleo essencial de alecrim).

A presença mais elevada da ordem Gammaproteobacteria unclassified nas dietas Alho A (4.970) e Alho B (3.562,66), em comparação com a dieta Alecrim B (2.644), sugere um possível efeito seletivo do óleo essencial de alho sobre populações microbianas dessa classe. As Gammaproteobacteria compreendem diversos gêneros oportunistas que podem estar associados a respostas inflamatórias no rúmen e à adaptação a condições ambientais de estresse, como desequilíbrios fermentativos e excesso de proteína degradável no rúmen (Zhang et al., 2020). A menor abundância observada na dieta Alecrim B pode refletir uma menor disponibilidade de substratos nitrogenados fermentáveis ou um ambiente menos favorável à proliferação dessas bactérias. Essa redução pode ser benéfica, indicando menor degradação de proteína verdadeira no rúmen e, portanto, menor produção de amônia, favorecendo a utilização

1303 mais eficiente do nitrogênio dietético na forma de proteína metabolizável. Tal efeito
1304 está alinhado com a literatura que aponta propriedades moduladoras dos óleos
1305 essenciais, especialmente do alecrim, na redução da proteólise ruminal (Iommelli et
1306 al., 2025; Sha et al., 2024).

1307 A ordem *Clostridiales* também apresentou variação entre dietas, com maior
1308 abundância nas dietas Alho A (2.688,66) e Alecrim B (2.324,66). Membros dessa
1309 ordem são conhecidos por sua capacidade de fermentar fibras e produzir butirato, um
1310 AGCC essencial para a saúde intestinal e integridade da mucosa ruminal (Denman;
1311 Morgavi; McSweeney, 2018). A maior abundância de *Clostridiales* nessas dietas pode
1312 indicar uma contribuição relevante para a fermentação de fibras e produção de
1313 butirato, beneficiando o ambiente ruminal.

1314 No nível de família, Prevotellaceae foi a mais representativa em todas as dietas,
1315 seguida por Selenomonadaceae e Gammaproteobacteria unclassified. A dieta Sem
1316 aditivo apresentou o maior valor médio para Prevotellaceae (12.311,0), sugerindo
1317 influência dos óleos essenciais de alho e alecrim na diminuição do número bacteriano
1318 desta família.

1319 No nível de gênero, *Prevotella* foi o táxon dominante em todas as dietas
1320 experimentais, com a maior média observada na dieta Sem aditivo (10.442,7), seguido
1321 por *Gammaproteobacteria unclassified*, *Prevotellaceae unclassified*,
1322 *Selenomonadaceae unclassified* e *Lachnospiraceae unclassified*. A abundância de
1323 *Prevotella* foi particularmente reduzida na dieta contendo Alecrim B (5.327,7),
1324 sugerindo possível atuação inibitória do óleo essencial de alecrim sobre bactérias
1325 desse gênero. Essa prevalência de *Prevotella*, especialmente nas dietas Sem aditivo
1326 e Alho A (7.331,33), é coerente com seu papel já descrito na literatura como um
1327 gênero-chave na degradação de polissacarídeos não fibrosos e proteínas, além da
1328 produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), especialmente propionato,
1329 contribuindo para o melhor aproveitamento energético da dieta (Betancur-Murillo;
1330 Aguilar-Marín; Jovel, 2022)

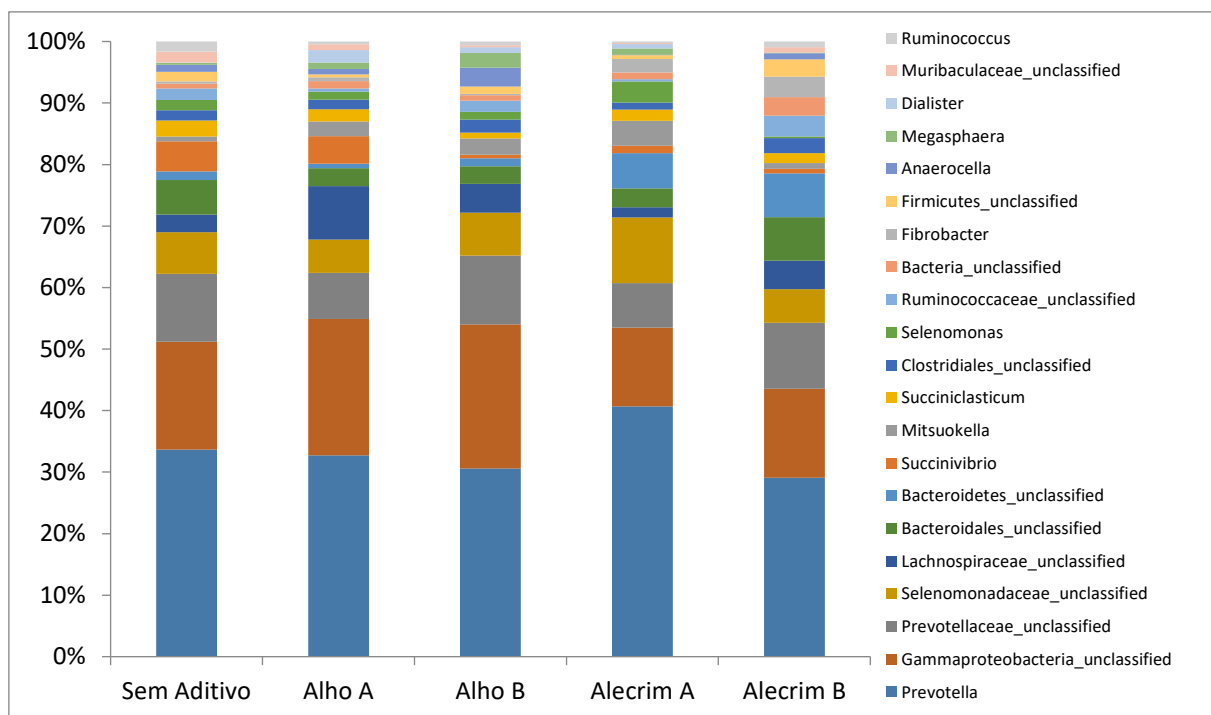


Figura 2. Distribuição relativa dos principais gêneros bacterianos da microbiota ruminal de cordeiros confinados alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim. As colunas representam a composição média dos gêneros bacterianos nos animais alimentados com as seguintes dietas: Sem aditivo (dieta controle, sem inclusão de óleos essenciais), Alho A (dieta com 1,00 mL/L de líquido ruminal de óleo essencial de alho), Alho B (0,14 mL/L de óleo essencial de alho), Alecrim A (1,00 mL/L de óleo essencial de alecrim) e Alecrim B (0,40 mL/L de óleo essencial de alecrim).

A maior abundância de *Mitsuokella* na dieta sem aditivo (1.046) e de *Megasphaera* na dieta Alecrim A (529,66) sugere que a inclusão destes óleos essenciais influencia diretamente a composição microbiana. Esses táxons estão associados à fermentação de carboidratos solúveis e produção de lactato e succinato, o que pode contribuir para a manutenção do pH ruminal (Cabral; Weimer, 2024; Koike et al., 2021a).

O gênero *Selenomonas* foi mais abundante na dieta sem aditivo (882), indicando sua atuação na rápida fermentação de açúcares simples e na produção de AGCCs, particularmente o propionato (Iommelli et al., 2025). A ausência de compostos antimicrobianos como os óleos essenciais pode favorecer a expansão desse gênero.

A presença de *Dialister* foi significativa apenas em Alho A (455,33), sugerindo uma possível resistência ou adaptação a compostos sulfurados como a alicina, encontrados no óleo essencial de alho. Segundo Zhu et al., (2021), componentes da casca de alho podem modular a microbiota ruminal de forma seletiva, favorecendo táxons específicos.

O gênero *Fibrobacter*, reconhecido pela degradação eficiente de celulose, foi mais abundante nas dietas Alecrim B (617,33) e sem aditivo (558), o que sugere que concentrações elevadas de óleos essenciais, principalmente de alho, podem suprimir populações celulolíticas sensíveis (Jewell et al., 2013).

Acidaminococcus foi o gênero mais abundante na dieta Alho A (136), consistindo em um gênero conhecido por utilizar aminoácidos como substratos para fermentação, o que pode estar relacionado à seletividade do óleo essencial de alho sobre comunidades proteolíticas (Chaves et al., 2008a). Essa modulação pode ter implicações importantes para o metabolismo de nitrogênio no rúmen, uma vez que a fermentação de aminoácidos pode alterar o perfil de disponibilidade de compostos nitrogenados para os microrganismos ruminais. De acordo com Ribeiro; Macedo Junior; Silva, (2014), a proteína degradável no rúmen é a principal fonte de nitrogênio para a microbiota, sendo essencial para a síntese de proteína microbiana e, consequentemente, para o desempenho produtivo dos ruminantes.

As populações metanogênicas identificadas neste estudo foram representadas principalmente pelos gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanomassiliicoccus*, ambos amplamente reconhecidos por sua participação na metanogênese no rúmen. A maior abundância de arqueas foi observada na dieta Alecrim B (25,00), seguida por Alecrim A (7,33), Alho A (9,00), Sem aditivo (7,66) e Alho B (4,66).

Embora Alecrim B tenha apresentado o maior número absoluto de metanogênicos, esse resultado não deve ser interpretado isoladamente. A ação seletiva dos compostos bioativos presentes nos óleos essenciais, como o cineol no alecrim e a alicina no alho, influenciam de maneira distinta os grupos microbianos do rúmen. Enquanto os compostos do alho parecem exercer efeito supressor mais direto sobre arqueas, a dosagem moderada do óleo de alecrim pode ter favorecido um ambiente fermentativo mais eficiente. A análise da razão entre arqueas metanogênicas e bactérias celulolíticas (representadas por *Fibrobacter*) revelou insights importantes sobre a eficiência energética das dietas. Apesar da maior abundância absoluta de metanogênicos em Alecrim B, a proporção metanogênicos/*Fibrobacter* foi de apenas 0,040, indicando um perfil microbiano mais equilibrado e eficiente, com menor produção relativa de metano por unidade de fibra degradada. Em contraste, Alecrim A apresentou a maior razão (0,150), sugerindo

perdas energéticas mais acentuadas. A dieta sem aditivo teve a menor relação (0,019), evidenciando alto rendimento fermentativo, enquanto Alho B (0,067) e Alho A (0,066) ficaram em posição intermediária. Assim, o desempenho observado na dieta Alecrim B reflete não apenas uma elevada atividade celulolítica, mas também uma proporção metanogênica mais favorável dentre os aditivos testados, indicando melhor aproveitamento da fibra e maior eficiência energética da fermentação ruminal.

Esses achados reforçam a importância de compreender não apenas a abundância absoluta dos grupos microbianos, mas também suas proporções e funções na dinâmica fermentativa do rúmen. Complementando esses resultados, estudos recentes utilizando abordagens multi-ômicas demonstram que compostos bioativos de plantas, como os óleos essenciais de alho e alecrim, modulam significativamente a composição e função da microbiota ruminal, impactando diretamente a eficiência fermentativa, o metabolismo energético e a resposta imune do hospedeiro (Sha et al., 2024).

CONCLUSÃO

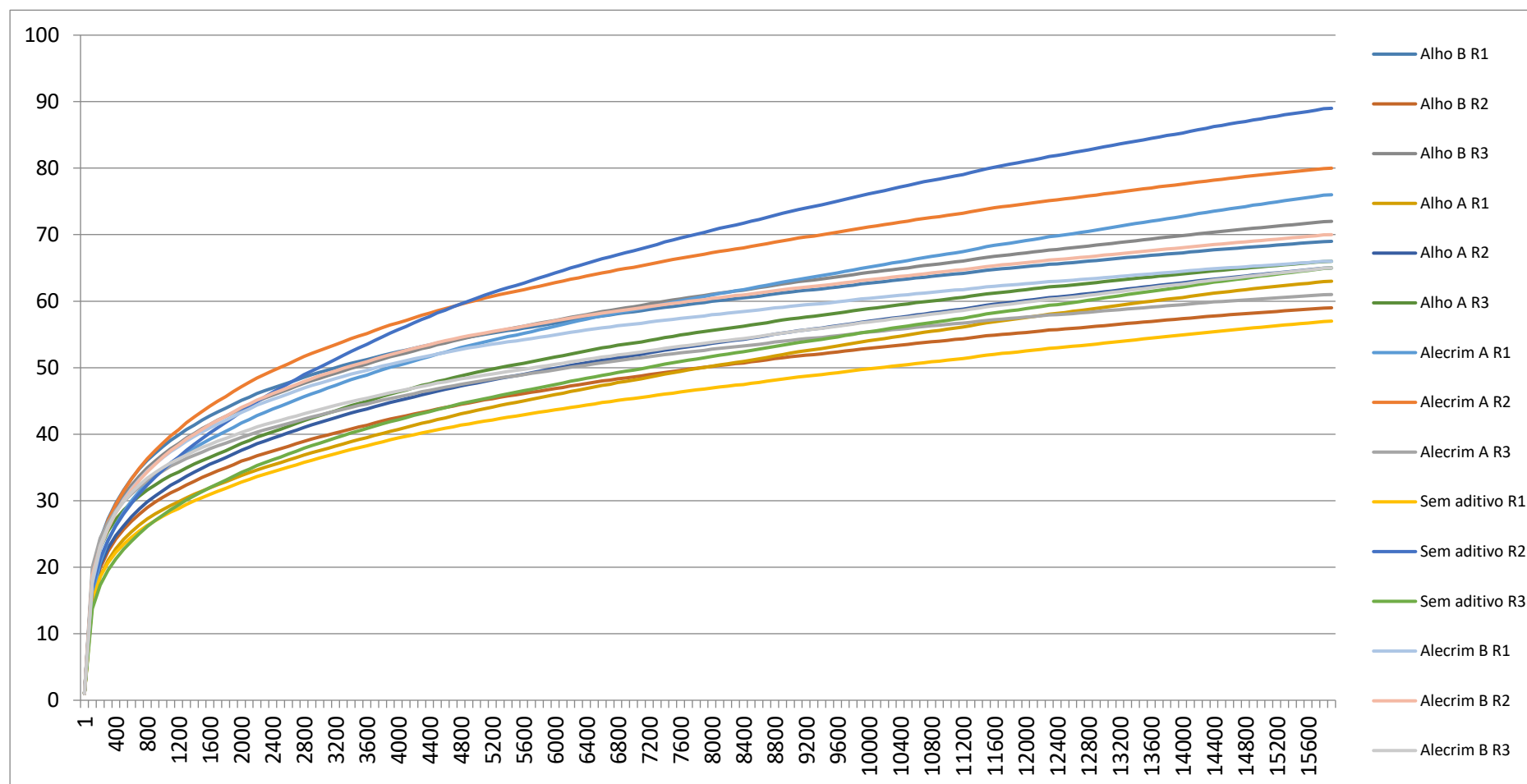
A suplementação com óleos essenciais de alho e alecrim modulou a microbiota ruminal de forma seletiva. Ambos os óleos essenciais reduziram a abundância de *Prevotella* e *Selenomonas*, gêneros importantes na fermentação de carboidratos não fibrosos. Por outro lado, a dieta contendo alecrim em menor dosagem favoreceu a população de *Fibrobacter*, indicando preservação da atividade celulolítica. Apesar da maior abundância absoluta de arqueas metanogênicas na dieta Alecrim B, a relação entre microrganismos metanogênicos e celulolíticos foi mais favorável, sugerindo menor perda energética por metanogênese. Assim, o uso de óleos essenciais, especialmente em dosagens moderadas, mostra-se uma alternativa promissora para melhorar a eficiência fermentativa em sistemas de confinamento de ruminantes.

1410 REFERÊNCIAS

- 1411 BETANCUR-MURILLO, Claudia Lorena; AGUILAR-MARÍN, Sandra Bibiana; JOVEL,
1412 Juan. Prevotella: A Key Player in Ruminal Metabolism. **Microorganisms**, v. 11, n. 1,
1413 p. 1, 20 dez. 2022.
- 1414 CABRAL, Luciano da Silva; WEIMER, Paul J. Megasphaera elsdenii: Its Role in
1415 Ruminant Nutrition and Its Potential Industrial Application for Organic Acid
1416 Biosynthesis. **Microorganisms**, v. 12, n. 1, p. 219, 21 jan. 2024.
- 1417 CASTILLO-GONZÁLEZ, AR *et al.* Rumen microorganisms and fermentation.
1418 **Archivos de medicina veterinaria**, v. 46, n. 3, p. 349–361, 2014.
- 1419 CAVALHEIRO JUNIOR, Elias Rodrigues *et al.* Effect of Supplying Rosemary
1420 (Rosmarinus officinalis L.) and Garlic (Allium sativum L.) Essential Oils to Feedlot
1421 Lambs on in vitro Ruminal Fermentation. **Frontiers in Animal Science**, v. 2, 2021.
- 1422 CHAVES, A. V. *et al.* Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and
1423 methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal
1424 Science**, v. 88, n. 1, p. 117–122, 1 mar. 2008.
- 1425 DENMAN, S. E.; MORGAVI, D. P.; MCSWEENEY, C. S. Review: The application of
1426 omics to rumen microbiota function. **Animal**, v. 12, p. s233–s245, 2018.
- 1427 IOMMELLI, Piera *et al.* Functional and Economic Role of Some Mediterranean
1428 Medicinal Plants in Dairy Ruminants' Feeding: A Review of the Effects of Garlic,
1429 Oregano, and Rosemary. **Animals** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI),
1430 , 1 mar. 2025.
- 1431 JEWELL, Kelsea A. *et al.* A phylogenetic analysis of the phylum Fibrobacteres.
1432 **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 376–382, set. 2013.
- 1433 KOIKE, S. *et al.* Rumen microbiota and its relation to fermentation in lactose-fed
1434 calves. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 10, p. 10744–10752, out. 2021.
- 1435 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**.
1436 New York: National Academy of Sciences, 2007.
- 1437 OLIVEIRA, Vinicius da Silva *et al.* CARBOIDRATOS FIBROSOS E NÃO FIBROSOS
1438 NA DIETA DE RUMINANTES E SEUS EFEITOS SOBRE A MICROBIOTA RUMINAL.
1439 **Veterinária Notícias**, v. 22, 1 out. 2016.
- 1440 RIBEIRO, Paola Rezende; MACEDO JUNIOR, Gilberto de Lima; SILVA, Simone
1441 Pedro. ASPECTOS NUTRICIONAIS DA UTILIZAÇÃO DA PROTEÍNA PELOS
1442 RUMINANTES. **Veterinária Notícias**, v. 20, n. 2, p. 1–14, 2014.
- 1443 SHA, Yuzhu *et al.* Multi-omics revealed rumen microbiota metabolism and host
1444 immune regulation in Tibetan sheep of different ages. **Frontiers in Microbiology**, v.
1445 15, 2024.

- 1446 STEWART, Robert D. *et al.* Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic
1447 sequencing of the cow rumen. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 870, 28 fev.
1448 2018.
- 1449 WANG, Yong; QIAN, Pei-Yuan. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes
1450 and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS**
1451 **ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 9 out. 2009.
- 1452 ZHANG, Qianqian *et al.* Bayesian modeling reveals host genetics associated with
1453 rumen microbiota jointly influence methane emission in dairy cows. **The ISME Journal**,
1454 v. 14, n. 8, p. 2019–2033, 1 ago. 2020.
- 1455 ZHU, W. *et al.* Garlic skin induces shifts in the rumen microbiome and metabolome of
1456 fattening lambs. **Animal**, v. 15, n. 5, p. 100216, maio 2021.
- 1457

1458 ANEXOS



1459 **Anexo 1.** Curvas de rarefação das amostras de microbiota ruminal de cordeiros submetidos a diferentes dietas com ou sem óleos
 1460 essenciais.

1461 **8 ARTIGO 3** - Metabolômica não-direcionada e metabolismo ruminal de ovinos:
 1462 efeitos dos óleos essenciais de alho e alecrim

1463

RESUMO

1464 Objetivou-se avaliar os efeitos da inclusão de óleos essenciais (OEs) de alho e alecrim
 1465 sobre o metaboloma ruminal de cordeiros, utilizando uma abordagem não-
 1466 direcionada. Foram testadas cinco dietas: sem aditivos; alho (0,14 e 1,00 mL/L de
 1467 líquido ruminal); e alecrim (0,40 e 1,00 mL/L de líquido ruminal). As dietas foram
 1468 formuladas com base em 30% de silagem de milho e 70% de concentrado composto
 1469 por milho moído e farelo de soja, sendo fornecidas ad libitum por 90 dias. Amostras
 1470 de líquido ruminal foram submetidas a dois métodos de extração (acetato de etila e
 1471 éter metil-terc-butilico) e analisadas por UHPLC-MS/MS. No total, 7.064 entidades
 1472 químicas foram detectadas, das quais 47 foram identificadas. A extração com éter
 1473 metil-terc-butilico apresentou maior número de metabólitos putativos, enquanto a
 1474 extração com acetato de etila favoreceu compostos de polaridade intermediária. A
 1475 análise de componentes principais (PCA) revelou separações entre as dietas, com
 1476 destaque para a dieta Alecrim B (0,40 mL/L), que apresentou agrupamento distinto
 1477 em ambas as extrações. Metabólitos como ácido sebáico, frutose 1,6-difosfato,
 1478 colestenona e aurantiamida foram identificados como potenciais marcadores
 1479 metabólicos. A menor dosagem de óleo essencial de alecrim promoveu uma
 1480 modulação específica do metaboloma ruminal, com impacto sobre rotas lipídicas e
 1481 proteicas. Contudo, a baixa taxa de identificação em relação ao total de entidades
 1482 detectadas destaca a necessidade de estudos metabolômicos adicionais para elucidar
 1483 os mecanismos subjacentes às alterações induzidas pelos óleos essenciais no
 1484 ambiente ruminal.

1485 **Palavras-chave:** Acetato de etila; Líquido ruminal; Matyash.

1486

ABSTRACT

1487 This study aimed to evaluate the effects of including essential oils (EOs) of garlic and
 1488 rosemary on the ruminal metabolome of lambs using an untargeted approach. Five
 1489 diets were tested: no additives; garlic (0.14 and 1.00 mL/L of ruminal fluid); and
 1490 rosemary (0.40 and 1.00 mL/L of ruminal fluid). Diets were formulated with 30% corn
 1491 silage and 70% concentrate composed of ground corn and soybean meal and were
 1492 offered ad libitum for 90 days. Ruminal fluid samples were subjected to two extraction
 1493 methods (ethyl acetate and methyl tert-butyl ether) and analyzed by UHPLC-MS/MS.
 1494 A total of 7,064 chemical entities were detected, of which 47 were identified. The
 1495 extraction with methyl tert-butyl ether yielded a greater number of putative metabolites,
 1496 while the ethyl acetate extraction favored compounds of intermediate polarity. Principal
 1497 component analysis (PCA) revealed clear separation among diets, with the Rosemary
 1498 B diet (0.40 mL/L) showing distinct clustering under both extraction methods.
 1499 Metabolites such as sebacic acid, fructose 1,6-bisphosphate, cholestenone, and
 1500 aurantiamide were identified as potential metabolic markers. The lower rosemary EO
 1501 dosage promoted a specific modulation of the ruminal metabolome, impacting lipid and
 1502 protein metabolic pathways. However, the low identification rate relative to the total
 1503 number of detected entities highlights the need for further metabolomic studies to
 1504 elucidate the mechanisms underlying essential oil-induced changes in the ruminal
 1505 environment.

1506 **Keywords:** Ethyl acetate; Ruminal fluid; Matyash.

1507 INTRODUÇÃO

1508 A intensificação dos sistemas de produção de cordeiros tem impulsionado o uso
1509 de estratégias nutricionais que visam melhorar a eficiência alimentar e reduzir
1510 impactos ambientais, com destaque para o uso de aditivos naturais como os óleos
1511 essenciais. Compostos bioativos extraídos de plantas, como o alho (*Allium sativum*) e
1512 o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), têm sido estudados por sua capacidade de modular
1513 a fermentação ruminal, a microbiota e a saúde dos ruminantes (García-Rodríguez et
1514 al., 2024).

1515 O óleo essencial de alho contém compostos sulfurados com reconhecida
1516 atividade antimicrobiana, capazes de favorecer a produção de propionato, reduzir a
1517 relação acetato/propionato e diminuir a produção de metano no rúmen. García-
1518 Rodríguez et al., (2024) demonstraram que o uso de óleo de alho reduziu
1519 significativamente a produção de metano e alterou populações microbianas, como
1520 *Ruminococcus albus*, em sistemas fermentativos *in vitro*. Em estudo *in vivo*, Rabee et
1521 al., (2025) observaram que a suplementação com pó de alho foi capaz de melhorar
1522 parâmetros hematológicos e modificar a microbiota ruminal de cordeiros, reforçando
1523 o potencial funcional desse aditivo.

1524 De forma semelhante, o óleo essencial de alecrim tem mostrado efeitos
1525 benéficos sobre o metabolismo antioxidante e o desempenho produtivo. Cetin et al.,
1526 (2023) relataram que a suplementação com óleo de alecrim em cordeiros Merino
1527 melhorou a capacidade antioxidante do sangue e influenciou positivamente a
1528 microbiota ruminal. Em estudo com ovelhas lactantes, Smeti et al., (2024) relataram
1529 que a inclusão de óleo de alecrim na dieta alterou o perfil lipídico do leite, com aumento
1530 da concentração de ácidos graxos poli-insaturados n-3, melhorando a qualidade
1531 nutricional do produto final.

1532 A metabolômica não-direcionada tem se consolidado como uma abordagem
1533 promissora para investigar os efeitos de aditivos alimentares sobre o ambiente
1534 ruminal, permitindo a identificação de metabólitos discriminantes e alterações
1535 funcionais da microbiota (Saleem et al., 2012). No entanto, ainda são escassos os
1536 estudos que avaliam comparativamente os efeitos de diferentes níveis de óleo
1537 essencial de alho e alecrim sobre o metaboloma ruminal de cordeiros, especialmente

1538 utilizando diferentes métodos de extração. Diante disso, o presente estudo teve como
1539 objetivo avaliar o metabolôma ruminal de cordeiros alimentados com dietas contendo
1540 diferentes níveis de óleo essencial de alho e alecrim, utilizando dois métodos de
1541 extração (acetato de etila e éter metil-terc-butílico), espectrometria de massas de alta
1542 resolução e análise multivariada para identificar compostos discriminantes entre as
1543 dietas e na caracterização das alterações induzidas pelos aditivos.

1544 MATERIAL E MÉTODOS

1545 O experimento foi conduzido na Fazenda Escola (FAZESC) da Universidade
1546 Estadual de Londrina (UEL), Paraná, após aprovação prévia do projeto pelo Comitê
1547 de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEL, sob número de protocolo 035.2022.

1548 Foram utilizados trinta e cinco machos, mestiços Texel x Dorper x Santa Inês,
1549 não castrados, com peso inicial médio de $26,3 \pm 6,20$ kg, com idade de 180 dias. Os
1550 animais foram alojados em baias individuais com piso ripado, comedouros e
1551 bebedouros individuais. Foram selecionados de forma aleatória três animais por dieta,
1552 para a coleta de líquido ruminal. O delineamento experimental utilizado foi
1553 inteiramente casualizado com cinco tratamentos (dietas) e três repetições (animais)
1554 por tratamento.

1555 As dietas fornecidas foram isoprotéicas e isoenergéticas, tendo como base 30%
1556 de silagem de milho e 70% de concentrado composto por farelo de soja, milho moído,
1557 fosfato bicálcico, calcário, óleo de soja e bicarbonato de sódio. As formulações
1558 atenderam às exigências nutricionais estabelecidas pelo NRC (2007), visando ganhos
1559 de peso de 250 g/dia. As dietas diferiram apenas quanto à inclusão ou não dos óleos
1560 essenciais de alho e alecrim.

1561 As dietas foram: Dieta 1: sem adição de óleo essencial na MS (sem aditivo);
1562 Dieta 2: inclusão de 1,00 mL de óleo essencial de alho por litro de líquido ruminal
1563 (alho(A)); Dieta 3: inclusão de 0,14 mL de óleo essencial de alho por litro de líquido
1564 ruminal (alho (B)); Dieta 4: inclusão de 1,00 mL de óleo essencial de alecrim por litro
1565 de líquido ruminal (alecrim(A)) e Dieta 5: inclusão de 0,40 mL de óleo essencial de
1566 alecrim por litro de líquido ruminal (alecrim (B)).

1567 Os óleos essenciais de alecrim e alho foram adquiridos de empresas comerciais.

Os óleos essenciais foram dissolvidos no óleo de soja e misturado ao concentrado. As dosagens de óleos essenciais foram testadas seguindo o recomendado pelo trabalho de Cavalheiro Junior et al., (2021).

Os animais foram alimentados ad libitum, duas vezes ao dia (às 08h00 e às 16h00), durante 90 dias de confinamento. Para estimativa do consumo, diariamente foram realizadas pesagens da dieta total fornecida (volumoso e concentrado) e das sobras individuais. A quantidade de ração ofertada era ajustada com base no consumo de matéria seca do dia anterior, visando manter um percentual de sobras entre 5 e 10% da matéria natural fornecida, a fim de evitar restrição alimentar e assegurar ingestão adequada. Ajustes eram realizados sempre que o valor de sobras estivesse fora desse intervalo por dois dias consecutivos.

Ao atingirem peso vivo médio de 40 kg, os animais foram transportados por aproximadamente 50 km até um frigorífico sob inspeção municipal. O abate seguiu normas de bem-estar animal, com insensibilização por eletronarcose, seguida de sangria, esfolagem e evisceração.

No momento do abate, foram coletados 10 mL de líquido ruminal dos animais previamente selecionados, utilizando tubos tipo Falcon previamente identificados. As amostras foram obtidas após filtração do conteúdo ruminal com auxílio de tecido tipo gaze em três camadas, com o objetivo de separar o líquido da fração sólida. Imediatamente após a coleta, o líquido ruminal foi acondicionado em gelo seco (aproximadamente -20°C) e transportado até o laboratório, onde foi armazenado a -80°C até o momento da extração.

Para a extração, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos e coletado todo o sobrenadante. Para extração em acetato de etila, uma alíquota de líquido ruminal (500 μL) foi misturada com 500 μL de acetato de etila e 250 μL de solução saturada de NaCl e água destilada. A solução foi agitada em vórtice durante 30 segundos e após a separação das fases, a camada orgânica superior foi reservada e a camada inferior foi misturada com outros 500 μL de acetato de etila, e 250 μL de solução saturada de NaCl e água destilada. Este procedimento foi repetido mais uma vez. As fases orgânicas foram combinadas e concentradas sob fluxo de nitrogênio. Após a secagem em fluxo de nitrogênio, foram adicionados às

1599 amostras 300 μ L de uma solução de álcool metílico e água destilada, numa
1600 concentração de 1:1 e agitado em vórtice por 1 min.

1601 Para extração éter metil-terc-butílico (Matyash et al., 2008) uma alíquota de
1602 líquido ruminal (500 μ L) foi misturada com 300 μ L álcool metílico gelado, 1 mL de éter
1603 metil-terc-butílico (MTBE), 250 μ L de solução saturada de NaCl, e água destilada. A
1604 solução foi agitada em vórtice durante 30s e após a separação das fases a camada
1605 orgânica superior foi reservada e a camada inferior foi misturada com outros 500 μ L
1606 MTBE, e 250 μ L de solução saturada de NaCl e água destilada. Este procedimento foi
1607 repetido mais uma vez. Essa extração resultou em duas fases da mesma amostra: a
1608 fase orgânica (MTBE) e a fase aquosa. A fase MTBE foi concentrada em fluxo de
1609 nitrogênio. Após a secagem em fluxo de nitrogênio, foi adicionado às amostras de fase
1610 MTBE 300 μ L de uma solução de álcool metílico e isopropanal numa concentração de
1611 1:1 e agitado em vórtice por 1 min.

1612 Os extratos foram analisados utilizando cromatografia líquida de ultra-alta
1613 eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplada a um espectrômetro de massas de
1614 alta resolução (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com duas
1615 fontes de ionização por eletrospray (ESI) e Ionização química à Pressão Atmosférica
1616 (APCI) respectivamente. A separação cromatográfica para as aquisições de ionização
1617 por ESI, tanto positivas e negativas, foram realizadas com uma coluna Acquity UPLC®
1618 CSH™ C18, tamanho de partícula de 1,7 μ m, com 2,1x100 mm (Waters, Irlanda) e
1619 vazão de 0,250 mL min⁻¹. A mistura de gradiente dos solventes A (H₂O ultrapura com
1620 0,1% (v/v) de ácido fórmico grau LC-MS) e B (metanol grau LC-MS no modo positivo),
1621 (metanol grau LC-MS com 0,1% (v/v) de ácido fórmico grau LC-MS no modo negativo)
1622 foram: 5% B 0-1 min, 70% B 1-15 min, 98% B 15-18 min e mantida a 98% de B 18-20
1623 min, 5% de B 20-22 min e mantida a 5% de B 22-25 min a 40 °C.

1624 A fonte de ionização por eletrospray foi operada em modos positivo e negativo
1625 de ionização e ajustados para 4.000 V com um potencial de *end plate offset* -500 V.
1626 Os parâmetros de gás de secagem foram ajustados para 9 L min⁻¹ a 200 °C e pressão
1627 do gás de nebulização a 4 bar. Os dados foram coletados de m/z 50 a 1.500 com uma
1628 taxa de aquisição de 3 Hz e os 3 íons mais intensos foram selecionados para
1629 fragmentação automática (AutoMS/MS).

Após a aquisição, os dados foram convertidos para o formato de arquivo mzXML, seguidos do agrupamento de espectros de fragmentação idênticos e múltiplos alinhamentos de espectros utilizando a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS, <https://gnps.ucsd.edu>). Na plataforma GNPS é definida a proximidade espectral entre todos os espectros de MS/MS de um conjunto de dados, tais relações são dispostas na forma de um mapa químico e podem ser visualizadas no programa Cytoscape. Para a anotação molecular, espectros de fragmentação (anexos) foram comparados a uma biblioteca espectral, incluindo a biblioteca espectral contribuída pela comunidade GNPS, bem como o Massbank, ReSpect, HMDB e NIST.

O molecular network (MN) foi gerado de modo que a tolerância de massa dos íons precursores fosse 0,02 Da, uma vez que este valor influencia o agrupamento de espectros de fragmentação quase idênticos. Para cada grupo de espectros de fragmentação considerado para agrupamento (criação de espectro consenso), a variação de massa dos íons fragmentos que podem ser deslocados de seus valores de m/z esperados foi estipulada como $\pm 0,02$ Da. As linhas (relações entre os *nodes*) foram formadas somente se a pontuação de cosseno fosse acima de 0,7 e, no mínimo, 4 picos correspondentes. Os espectros do MN foram então comparados com dados de bibliotecas espectrais do GNPS. Aos espectros da biblioteca, foram aplicados os mesmos parâmetros dos dados do líquido ruminal. Os espectros de fragmentação dos íons do mapa químico que foram identificados pelas bibliotecas do GNPS foram verificados manualmente por comparação com os espectros de fragmentação dos compostos propostos e os erros massa foram calculados.

Em seguida, os dados foram analisados na plataforma MetaboAnalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>), usando uma Análise de Componentes Principais (PCA). O pré-processamento de dados incluiu a filtragem de variância dos dados através do desvio padrão, em seguida os dados foram normalizados pela mediana, transformados pela raiz quadrada de valores de dados e a escala de Pareto foi usada (centrada na média e dividida pela raiz quadrada do desvio padrão de cada variável).

1659 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1660 Os dados compilados, foram utilizados para gerar as redes moleculares (MN)
1661 (Figuras 1 e 2) e diagramas de Venn (Figuras 3 e 4). Foram observadas 7.064
1662 entidades químicas no total, das quais 47 compostos foram identificados por
1663 correspondências moleculares em bases genômicas públicas (Tabela 1), o que
1664 representa 0,67 % das características moleculares detectadas.

1665 Na extração com acetato de etila, foram detectadas 3.269 entidades químicas
1666 (46,28 % do total), das quais 12 foram identificadas (Tabela 1). As entidades químicas
1667 exclusivas de cada dieta foram distribuídas da seguinte forma (Figura 1): em modo
1668 negativo Alho B (29), Alho A (92), Alecrim B (81), Alecrim A (81) e sem aditivo (64); e
1669 em modo positivo Alho B (72), Alho A (458), Alecrim B (145), Alecrim A (151) e sem
1670 aditivo (111). Entre os compostos identificados, destaca-se o ácido sebácico,
1671 encontrado exclusivamente na dieta Alho B. As demais substâncias identificadas
1672 foram comuns a mais de uma dieta.

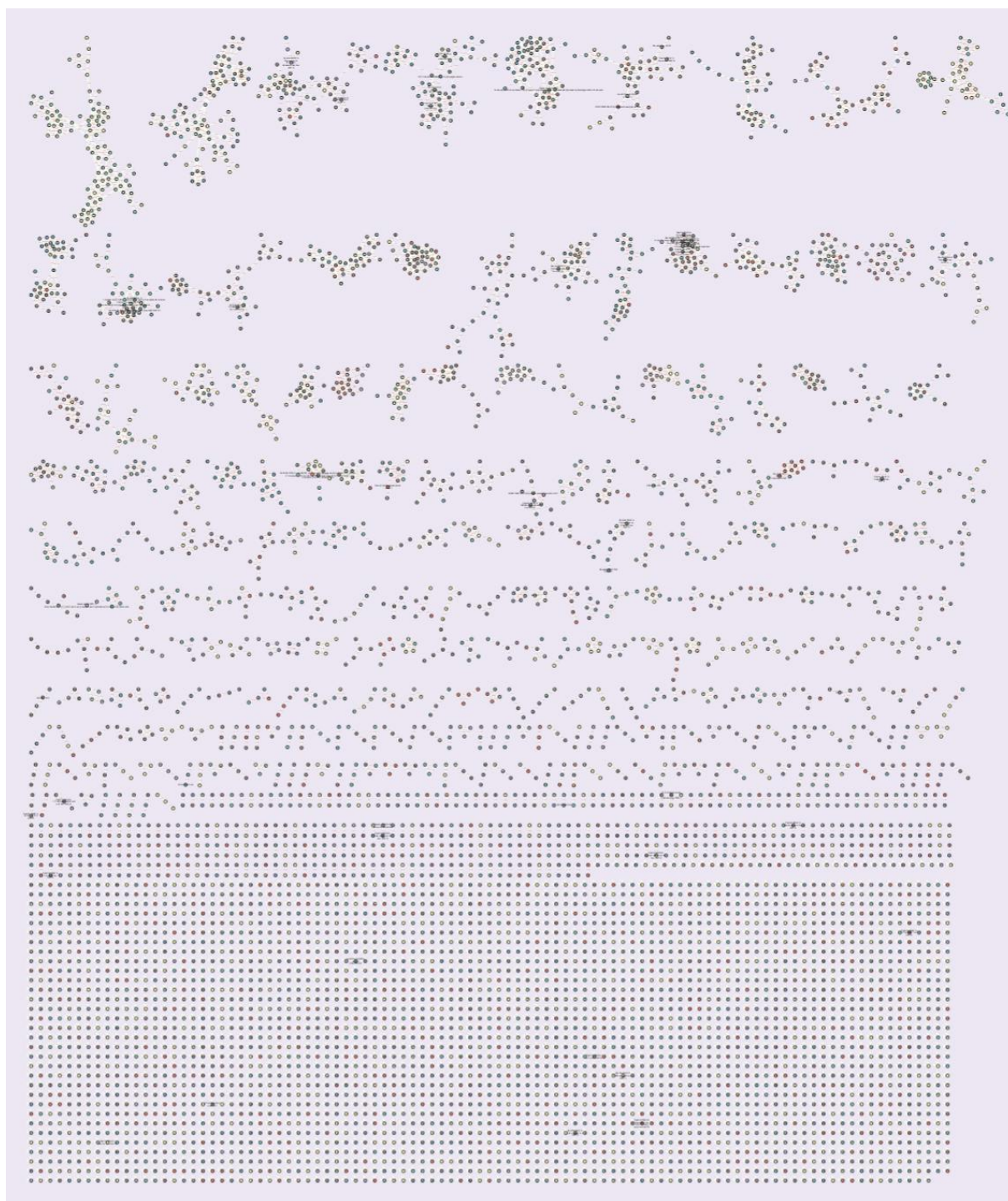
1673 A presença do ácido sebácico pode estar relacionada à modulação do
1674 metabolismo lipídico. Clemmons et al., (2020) relataram que variações na composição
1675 da dieta podem levar a diferenças no metaboloma do líquido ruminal, incluindo a
1676 presença de ácidos dicarboxílicos como o ácido sebácico, sugerindo que tais
1677 compostos podem servir como indicadores de mudanças no metabolismo ruminal
1678 associadas à eficiência alimentar. Além disso, segundo Wanders; Komen; Kemp,
1679 (2011), ácidos dicarboxílicos podem ser formados por meio da ω -oxidação de ácidos
1680 graxos, uma via metabólica alternativa que se torna mais ativa quando a β -oxidação
1681 mitocondrial está limitada. Assim, a inclusão do óleo essencial de alho, mesmo em
1682 baixa concentração, pode ter influenciado a microbiota ruminal, alterando o padrão de
1683 fermentação e favorecendo a formação de metabólitos como o ácido sebácico.

1684 Ao utilizar a extração com éter metil-terc-butílico, foram observadas 3.795
1685 entidades químicas (53,72 % do total), das quais 35 foram identificadas (Tabela 1). As
1686 entidades químicas exclusivas de cada dieta foram distribuídas da seguinte forma
1687 (Figura 2): em modo negativo Alho B (83), Alho A (57), Alecrim B (9), Alecrim A (43) e
1688 sem aditivo (64); e em modo positivo Alho B (688), Alho A (340), Alecrim B (105),
1689 Alecrim A (157) e sem aditivo (223). Dentre essas, apenas nove compostos foram

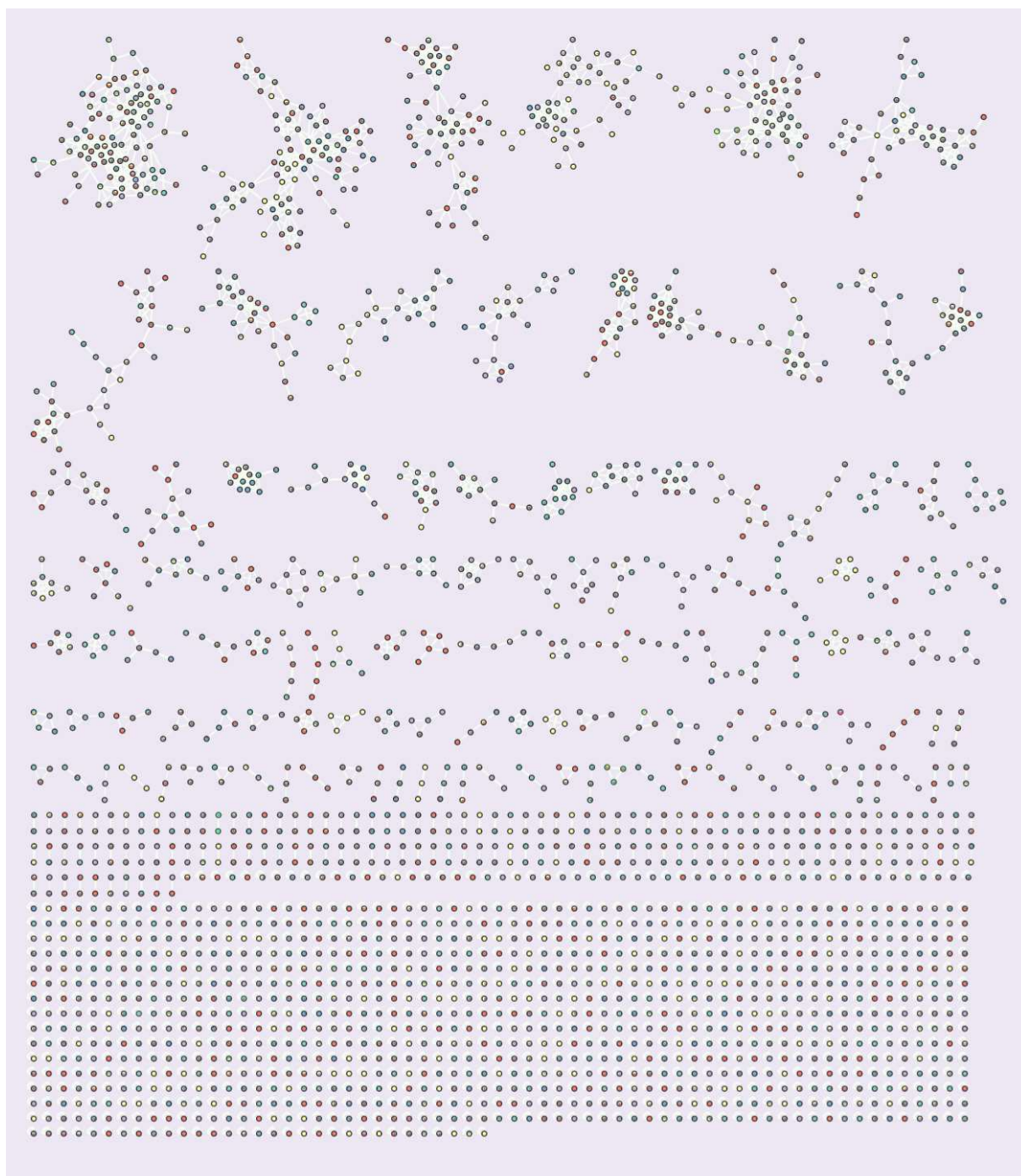
1690 identificados: ácido hidrojasmonico na dieta Alho B, frutose 1,6-bifosfato na dieta Alho
1691 A, ciclo (Pro-Leu), aurantiamida e éster didodecílico do ácido tio-bis-propanoico na
1692 dieta Alecrim A, colesteno na dieta Alecrim B. Na dieta sem aditivo foram
1693 identificados os compostos ácido 3-carboxitetraidro- β -carbolina, C2 fitoceramida e um
1694 ácido dicarboxílico.

1695 A detecção dos metabólitos ácido hidrojasmonico e frutose 1,6-difosfato, nas
1696 dietas Alho B e Alho A, respectivamente, pode estar associada a ajustes nas vias
1697 metabólicas ruminais em resposta à inclusão do óleo essencial de alho. Segundo
1698 Cavalheiro Junior et al., (2021), compostos bioativos presentes no óleo essencial de
1699 alho influenciam a fermentação ruminal e a produção de ácidos graxos de cadeia
1700 curta, além de apresentarem atividade antimicrobiana sobre a microbiota ruminal.
1701 Esses efeitos podem alterar a dinâmica dos processos fermentativos e favorecer a
1702 formação de metabólitos intermediários. O ácido hidrojasmonico é conhecido como
1703 um intermediário da biossíntese de jasmonatos em tecidos vegetais (Wasternack;
1704 Hause, 2013), e sua presença no rúmen pode refletir a degradação de metabólitos
1705 secundários derivados da dieta ou de compostos com estrutura semelhante. Já a
1706 frutose 1,6-bifosfato é um intermediário central da glicólise, envolvido no controle do
1707 fluxo de carbono e na produção de energia celular (Nelson; Cox, 2017). A modulação
1708 da microbiota por óleos essenciais pode alterar a disponibilidade de substratos ou a
1709 atividade enzimática, favorecendo o acúmulo de intermediários como a frutose 1,6-
1710 difosfato (Patra; Yu, 2012). Ambos os compostos indicam ajustes metabólicos
1711 induzidos pelos constituintes do óleo essencial de alho.

1712 **Figura 1.** Rede molecular (MN) gerada usando características moleculares do líquido ruminal
1713 de ovinos alimentados com diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim, extraídas
1714 por meio de acetato de etila e éter metil-terc-butilico, em modo positivo.



1715 **Figura 2.** Rede molecular (MN) gerada usando características moleculares do líquido ruminal
1716 de ovinos alimentados com diferentes dosagens de óleo essencial de alho e alecrim, extraídas
1717 por meio de acetato de etila e éter metil-terc-bufílico, em modo negativo.



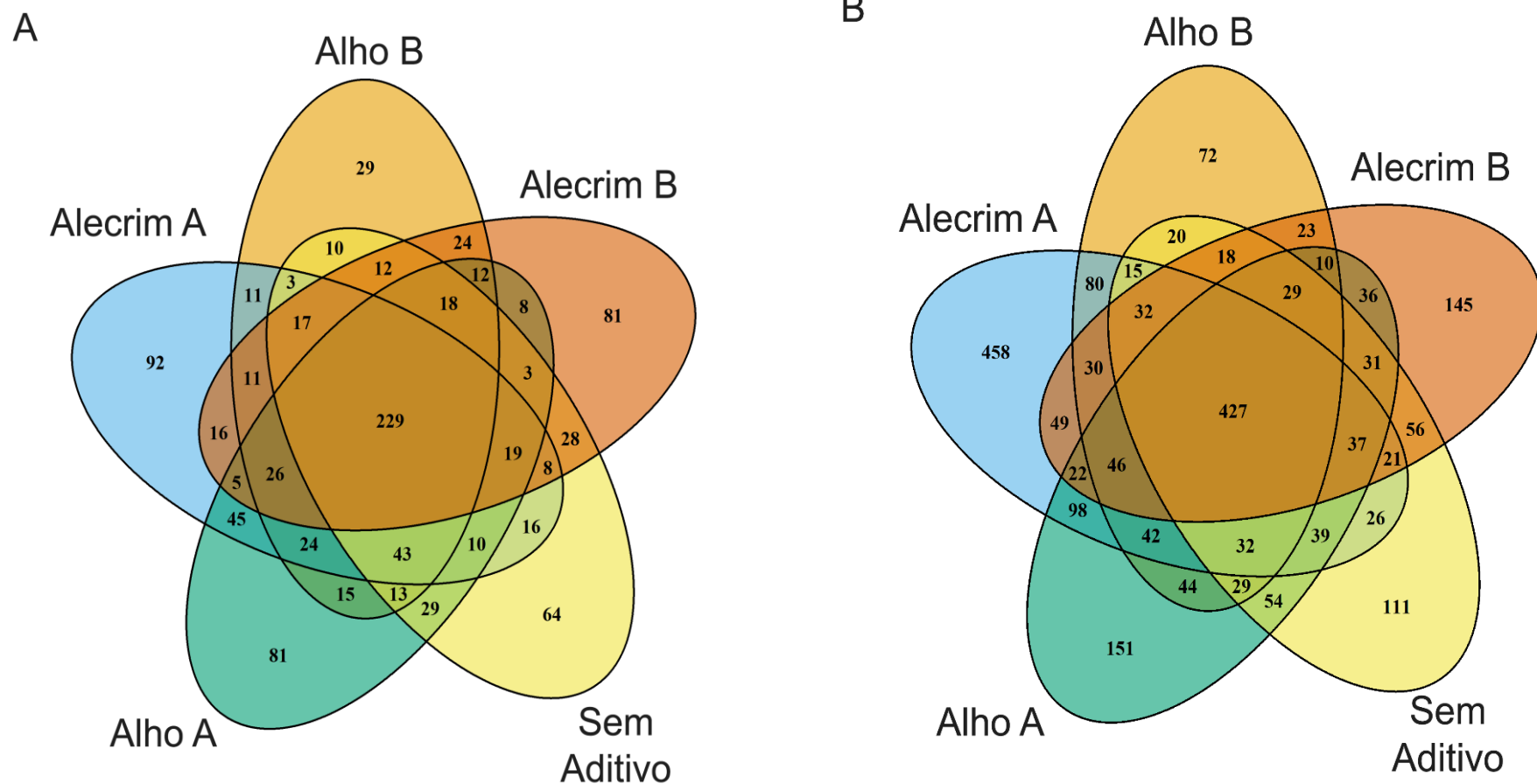
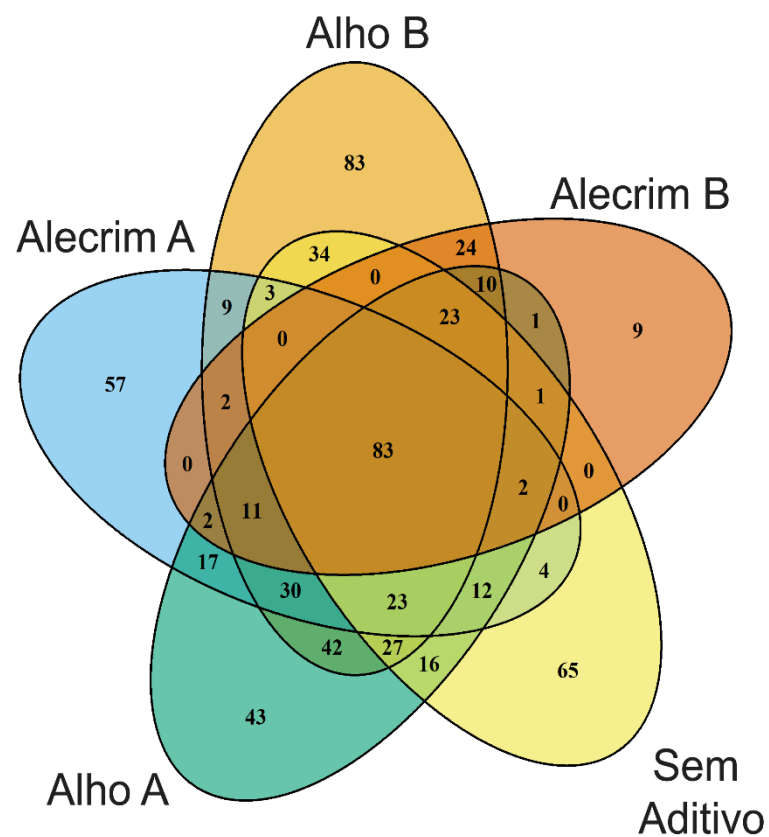
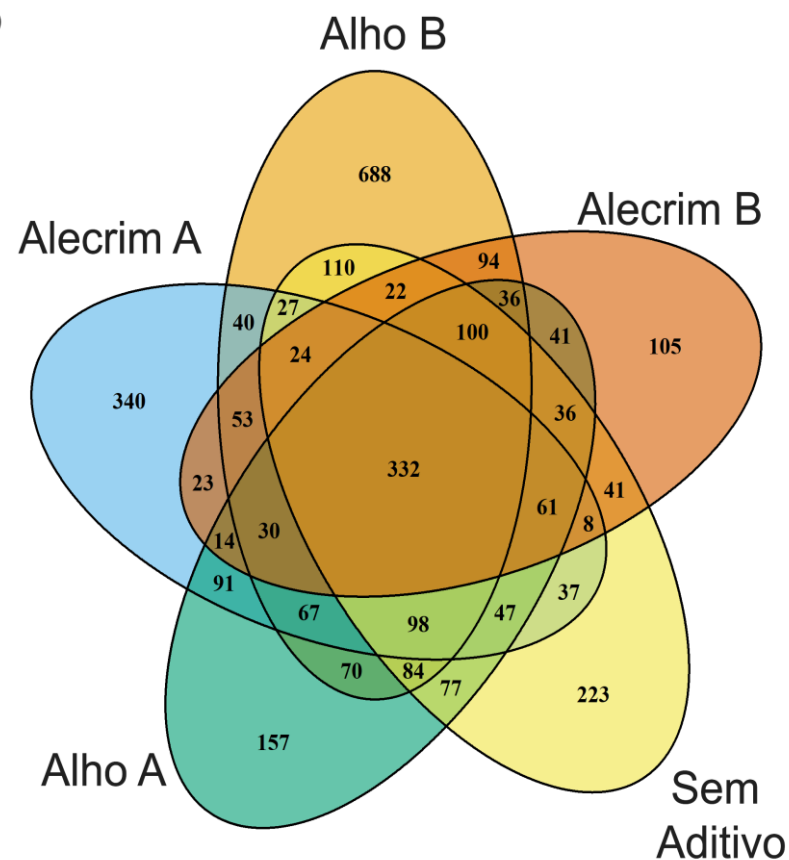


Figura 3. Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas do líquido ruminal de ovinos, alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim, extraído em acetato de etila, modo negativo (A) e positivo (B). Alho B = 0,14 ml por litro de líquido ruminal; Alho A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim B = 0,40 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal e sem aditivo = sem adição de óleo essencial.

A



B



1722 **Figura 4.** Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas do líquido ruminal de ovinos, alimentados com dietas contendo ou não
 1723 óleos essenciais de alho e alecrim, extração éter metil-terc-butílico, modo negativo (A) e positivo (B). Alho B = 0,14 ml por litro de líquido
 1724 ruminal; Alho A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim B = 0,40 ml por litro de líquido ruminal; Alecrim A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal
 1725 e sem aditivo = sem adição de óleo essencial

Tabela 1. Identificação dos metabólitos do líquido ruminal de ovinos alimentados com diferentes dosagens de óleos essenciais de alho e alecrim e analisado por UHPLC-MS/MS. Número e identificação do composto, fórmula molecular, massa monoisotópica teórica, *m/z* do íon observado, erro de massa, identificação da dieta e forma de extração.

Nº	Metabólito	Fórmula Molecular	Massa monoisotópica	<i>m/z</i> observado	Erro (ppm)	Dietas				AE (-)	AE (+)	MA (-)	MA (+)	MA MTBE (+)
						sem aditivo	Alho A	Alho B	Alecrim A	Alecrim B				
1	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	C ₃₉ H ₇₆ NO ₈ P	717.5289	718.5387	0.84		X	X		X				X
2	Ácido 3-carboxitetraidro-β-carbolina	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂	230.1052	229.0991	3.49	X						X		
3	Ácido azelaico	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.1044	187.0975	-0.53		X	X			X			
4	Ácido azelaico	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.1044	189.1123	1.06	X	X	X	X	X			X	
5	Ácido dicarboxílico	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	370.3072	371.3159	0.81	X								X
6	Ácido dodecanodióico	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	230.1512	231.158	-4.76	X	X	X	X	X	X			
7	Ácido dodecanodióico	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	230.1512	231.1585	-2.6	X		X	X	X			X	
8	Ácido hidrojasmonico	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	212.1407	213.1472	-6.1	X	X	X	X	X	X			
9	Ácido hidrojasmonico	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	212.1407	213.1469	-7.51			X					X	
10	Ácido jasmônico	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	210.1251	211.1318	-5.21	X	X	X	X	X	X			
11	Ácido monoisobutilftálico	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.0888	221.0793	-8.14	X	X	X	X	X	X			
12	Ácido monoisobutilftálico	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222.0888	223.0932	-14.79	X	X	X	X	X	X			
13	Ácido pantotênico	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.1102	218.1035	0.46	X	X	X	X	X		X		
14	Ácido pantotênico	C ₉ H ₁₇ NO ₅	219.1102	220.118	0.45	X	X	X	X	X			X	
15	Ácido pinélico	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	330.2397	329.2326	-0.91	X	X	X	X	X	X			
16	Ácido pinélico	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	330.2397	329.2332	-0.3	X			X	X		X		
17	Ácido Sebácico	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	202.1200	203.1268	-4.92			X			X			
18	Aurantiamida	C ₂₅ H ₂₆ N ₂ O ₃	402.1937	403.202	0.99				X					X
19	C2 Fitoceramida	C ₂₀ H ₄₁ NO ₄	359.3025	358.2975	3.35	X						X		
20	Ciclo(Pro-Leu)	C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₂	210.1364	211.1439	-0.95				X				X	
21	Colestenona	C ₂₇ H ₄₄ O	384.3381	385.3462	-0.78	X	X	X		X				X
22	Costunolide	C ₁₅ H ₂₀ O ₂	232.1458	233.1534	-0.86	X	X	X		X				X
25	Dimiristoil cefalina	C ₃₃ H ₆₆ NO ₈ P	635.4509	636.4619	3.14		X			X				X
26	Enterolactona	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	298.1200	299.1271	-2.34	X	X	X		X				X
27	Erucamida	C ₂₂ H ₄₃ NO	337.3334	338.3421	1.18	X	X	X	X	X				X
28	Esfinganina	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	301.2971	302.3048	-1.98		X			X				X

Continuação

29	Esqualeno	C ₃₀ H ₅₀	410.3900	411.3976	-2.19		X			X							X
30	Éster didodecílico do ácido tio-bis-propanoico	C ₃₀ H ₅₈ O ₄ S	514.4041	515.4134	0.97						X						X
31	fenilalanil-glutamina	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₄	293.1371	294.1443	-1.7		X										X
32	Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.0787	166.0858	-3.01	X	X	X	X								X
33	Frutose 1,6-difosfato	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	339.9956	338.9881	-2.06		X								X		
34	Gama-undecalactona	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	184.1458	185.1528	-4.32	X	X	X	X	X		X					
35	heptadecasinganina	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	287.2815	288.2896	-0.35		X	X		X							X
36	Ile-Leu-Lys	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₄	372.2728	373.2811	0.54		X	X	X							X	
37	N-(5-acetamidopentil) acetamida	C ₉ H ₁₈ N ₂ O ₂	186.1364	187.1438	-1.6	X		X	X	X						X	
38	N-acetil-L-leucina	C ₈ H ₁₅ NO ₃	173.1048	174.1116	-5.17		X	X	X							X	
39	N-butilil-metionina	C ₉ H ₁₇ NO ₃ S	219.0925	220.1001	-0.45		X		X							X	
40	N-Glicil-L-isoleucina	C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₃	188.1157	189.1233	-0.53	X	X	X	X							X	
41	Riboflavina	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₉ P	456.1041	455.0967	-1.32	X	X	X	X						X		
42	sacarose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.1155	341.108	-2.64	X	X	X	X			X					
43	Tirosina	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.0736	182.0803	-4.94	X	X	X	X	X						X	
44	Triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.0896	203.0821	-2.46	X	X	X	X	X				X			
45	Triptofano	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.0896	205.0963	-4.39	X	X	X	X	X						X	
46	Uridina	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.0692	243.0608	-6.17	X	X	X	X			X					
47	Wallemine	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	252.1719	253.1791	-2.76		X		X	X							X

Nº = número do metabólito; *m/z* = razão massa/ carga; ppm = partes por milhão; Sem aditivo = sem adição de óleos essenciais; Alho A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal, Alho B = 0,14 ml por litro de líquido ruminal, Alecrim A = 1,00 ml por litro de líquido ruminal, Alecrim B = 0,40 ml por litro de líquido ruminal; AE (-) = extração com acetato de etila em modo negativo; AE (+) = extração com acetato de etila em modo positivo; MA (-) = extração Matyash fase aquosa em modo negativo; MA (+) = extração Matyash fase aquosa em modo positivo; MA MTBE (+) = extração Matyash fase orgânica ou éter metil-terc-butilico (MTBE) em modo positivo.

A detecção de compostos como ciclo (Pro-Leu), aurantiamida e éster didodecílico do ácido tio-bis-propanoico na dieta Alecrim A sugere que a inclusão do óleo essencial de alecrim promoveu alterações relevantes nas vias metabólicas ruminais. De acordo com Cavalheiro Junior et al., (2021), os compostos majoritários do óleo essencial de alecrim, como 1,8-cineol e α -pineno, afetam a fermentação no rúmen e modificam o perfil microbiano, influenciando a degradação de carboidratos e a produção de gases e também relatam que o óleo de alecrim atua sobre a bio-hidrogenação de ácidos graxos e altera o metabolismo de nutrientes, o que pode favorecer a formação de peptídeos cíclicos, como o ciclo (Pro-Leu), e de derivados de triptofano, como a aurantiamida, além de interferir na síntese de ésteres lipídicos complexos.

Na dieta Alecrim B, a identificação de colestenoína pode indicar modificações no metabolismo de esteróis, mesmo sob menor inclusão de óleo essencial de alecrim. Patra; Yu, (2012) demonstraram que óleos essenciais podem interferir significativamente na composição e atividade da microbiota ruminal, impactando rotas fermentativas e metabólicas. Nesse contexto, a presença de colestenoína pode refletir a ação de enzimas microbianas sobre esteróis ou compostos estruturais semelhantes, revelando uma resposta adaptativa da microbiota à presença dos constituintes bioativos do óleo de alecrim, mesmo em baixas concentrações.

Por fim, na dieta sem aditivo, a identificação dos compostos ácido 3-carboxitetraidro- β -carbolina, C2 fitoceramida e um ácido dicarboxílico pode estar associada à atividade metabólica basal da microbiota ruminal, em um ambiente não modulado por óleos essenciais. A β -carbolina detectada é um derivado do triptofano comumente formado por ação microbiana em ambientes anaeróbios, sendo reconhecida por seu potencial bioativo e presença em processos fermentativos (Herraiz et al., 2011). Já a C2 fitoceramida, uma esfingolípida bioativa, está envolvida em rotas de sinalização celular e pode derivar tanto da microbiota quanto de interações com componentes estruturais da dieta (Hanada et al., 2018). Esses achados sugerem que, mesmo na ausência de aditivos, o ambiente ruminal expressa vias fermentativas diversas, compatíveis com o metabolismo natural da microbiota ruminal.

A Tabela 2 apresenta a distribuição percentual dos metabólitos identificados por

1765 UHPLC-MS/MS nas extrações com acetato de etila e com éter metil-terc-butílico,
1766 organizados de acordo com suas respectivas classes químicas putativas. A análise
1767 da composição química dos metabólitos identificados revelou que aminoácidos e
1768 peptídeos constituíram a classe mais abundante, representando 18,18% do total
1769 identificado. Esses compostos são fundamentais para o crescimento e manutenção
1770 da microbiota ruminal, mas sua rápida degradação pode resultar em perdas
1771 nitrogenadas consideráveis (Wang, 2022). A presença de triptofano, fenilalanina,
1772 tirosina e de peptídeos como ciclo (Pro-Leu) e Ile-Leu-Lys sugere tanto atividade
1773 proteolítica microbiana quanto a liberação de fragmentos peptídicos funcionais
1774 oriundos da dieta, com possível atuação antimicrobiana.

1775 Os lipídeos e fosfolipídeos corresponderam a 15,91% dos compostos
1776 identificados, incluindo moléculas como C2 fitoceramida, esfinganina, erucamida e
1777 dimiristoil cefalina. Essas substâncias estão envolvidas na estrutura de membranas
1778 microbianas e em rotas de sinalização intracelular. Buccioni et al., (2012)
1779 demonstraram que os lipídios dietéticos são amplamente transformados no rúmen por
1780 hidrólise e bio-hidrogenação, afetando significativamente a composição de ácidos
1781 graxos disponíveis e a dinâmica da microbiota. Tais alterações podem ser ainda mais
1782 relevantes diante da presença de aditivos bioativos, como os óleos essenciais, que
1783 interagem diretamente com a composição lipídica das membranas microbianas e
1784 modulam a atividade da microbiota ruminal. Segundo Cobellis; Trabalza-Marinucci;
1785 Yu, (2016), os óleos essenciais possuem compostos bioativos que podem alterar a
1786 permeabilidade das membranas celulares de microrganismos ruminais, interferindo
1787 em processos metabólicos essenciais e, consequentemente, influenciando a
1788 fermentação ruminal.

1789 Os ácidos dicarboxílicos representaram 11,36% dos metabólitos identificados,
1790 indicando a possível ativação de vias metabólicas complementares à oxidação
1791 clássica de ácidos graxos. Segundo Ranea-Robles; Houten, (2023), a ω -oxidação é
1792 uma via metabólica alternativa significativa para a degradação de ácidos graxos de
1793 cadeia média e longa, especialmente em situações de sobrecarga lipídica ou quando
1794 a β -oxidação mitocondrial está comprometida. Esse processo resulta na formação de
1795 ácidos dicarboxílicos, como os ácidos azelaico, adípico e sebácico. Além disso, certos
1796 dicarboxílicos introduzidos via dieta, como o malato, exercem funções específicas no
1797 ambiente ruminal, atuando como aceptores de hidrogênio e favorecendo a conversão

1798 de lactato em propionato por espécies como *Selenomonas ruminantium*. De acordo
 1799 com Zhou et al., (2024), a suplementação de vacas leiteiras com 3-nitrooxypropanol
 1800 associado ao ácido málico resultou em redução da emissão de metano entérico,
 1801 aumento da proporção molar de propionato no líquido ruminal e melhoria nos
 1802 indicadores de eficiência fermentativa.

1803 **Tabela 2.** Porcentagem em relação ao total de metabólitos putativos identificados a
 1804 partir da extração por acetato de etila e éter metil-terc-butilíco, analisado por UHPLC-MS/MS.

Classe	(%)	Metabólito
Aminoácidos e Peptídeos	18.18	Triptofano; Fenilalanina; Tirosina; Ciclo (Pro Leu); Ile-Leu-Lys; N-Glicil-L-isoleucina; Fenilalanil-glutamina
Lipídeos e Fosfolipídeos	15.91	C2 Fitoceramida; Esfinganina; Heptadecasinganina; Erucamida; Esqualeno; Dimiristoil cefalina; 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
Ácidos Dicarboxílicos	11.36	Ácido azelaico; ácido sebáico; Ácido dodecanodióico; Ácido adípico; ácido dicarboxílico
Lactonas	9.09	Gama-undecalactona; Costunolide; Enterolactona; Wallemine
Carboidratos e Derivados	6.82	Sacarose; Frutose 1,6-difosfato; Uridina
Acetamidas	4.55	N-(5-acetamidopentil) acetamida; N-acetil-L-leucina
Ácidos Graxos Modificados	4.55	Ácido jasmônico; Ácido hidrojasmonico
Ésteres e Derivados	4.55	Éster didodecílico do ácido tio-bis-propanoico; Ácido monoisobutilftálico
Esteroides e Derivados	4.55	Colestenona; 5 α -Coletano-3-ona
Indóis	4.55	Triptofano; 1,2,3,4-Tetrahydroharmane-3-carboxylic acid
Vitaminas e Cofatores	4.55	Ácido pantotênico; Detiobiotina
Alcaloides	2.27	1,2,3,4-Tetrahydroharmane-3-carboxylic acid
Fenilpropanoides	2.27	Aurantiamida
Lignanas	2.27	Enterolactona
Monoterpeno	2.27	Ácido pinélico
Purinas	2.27	Riboflavina

1805 Classes menos representativas incluíram lactonas (9,09%), carboidratos e
 1806 derivados (6,82%), acetamidas, ácidos graxos modificados, ésteres, esteroides,
 1807 indóis, vitaminas e cofatores (4,55% cada), além de alcaloides, fenilpropanoides,
 1808 lignanas, monoterpenos e purinas (2,27%). Embora menos frequentes, esses
 1809 compostos compõem rotas fermentativas e biossintéticas diversas. A identificação de

moléculas como frutose 1,6-bifosfato, uridina, gama-undecalactona e enterolactona reforça a complexidade do metaboloma ruminal e sua capacidade de adaptação frente às diferentes estratégias nutricionais.

Análises multivariadas (PCA) (Figuras 5 e 6) e um diagrama de Venn (Figura 7) foram empregadas com o intuito de explorar os padrões globais de variação entre as dietas experimentais e comparar a eficiência analítica dos métodos de extração com acetato de etila e éter metil-terc-butílico. Essas abordagens complementam a interpretação individual dos compostos identificados, permitindo uma avaliação mais ampla da resposta metabolômica frente à inclusão dos óleos essenciais de alho e alecrim.

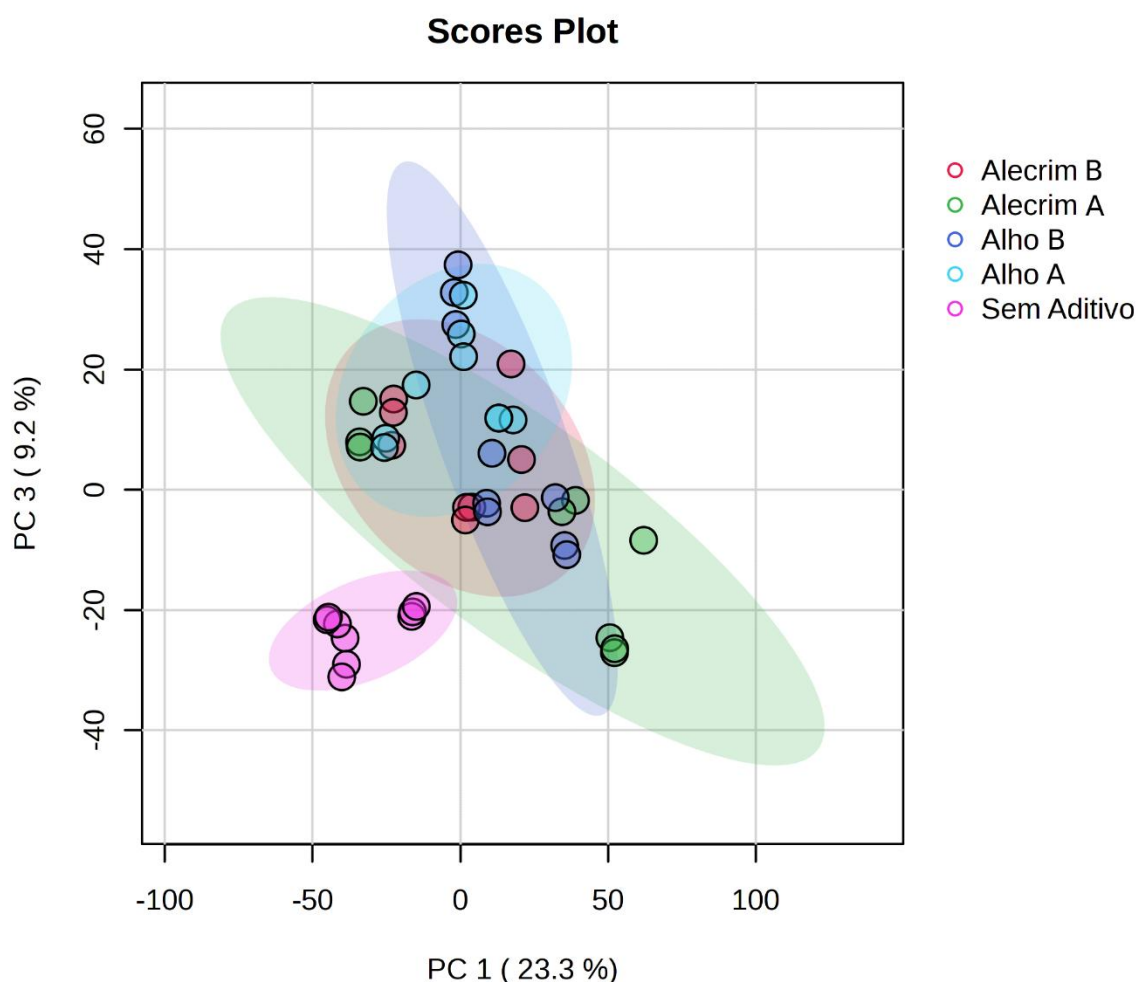


Figura 5. Análise de Componentes Principais das amostras extraídas com acetato de etila, sem aditivo = sem adição de óleos essenciais; Alho A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alho B = 0,14 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim B = 0,40 mL por litro de líquido ruminal.

A análise de PCA referente à extração com acetato de etila demonstrou que os

componentes principais, PC1 (23,3 %) e PC3 (9,2 %), explicaram 32,5 % da variância total dos dados. Observou-se separação parcial entre os grupos dietéticos, com destaque para o agrupamento da dieta Alecrim B, que se afastou significativamente da dieta sem aditivo ($p = 0,001$; $R^2 = 0,63$). As dietas contendo óleo essencial de alho apresentaram maior dispersão entre os indivíduos, enquanto os grupos que receberam óleo de alecrim mostraram sobreposição parcial, sugerindo perfis metabólicos próximos entre Alecrim B e Alecrim A.

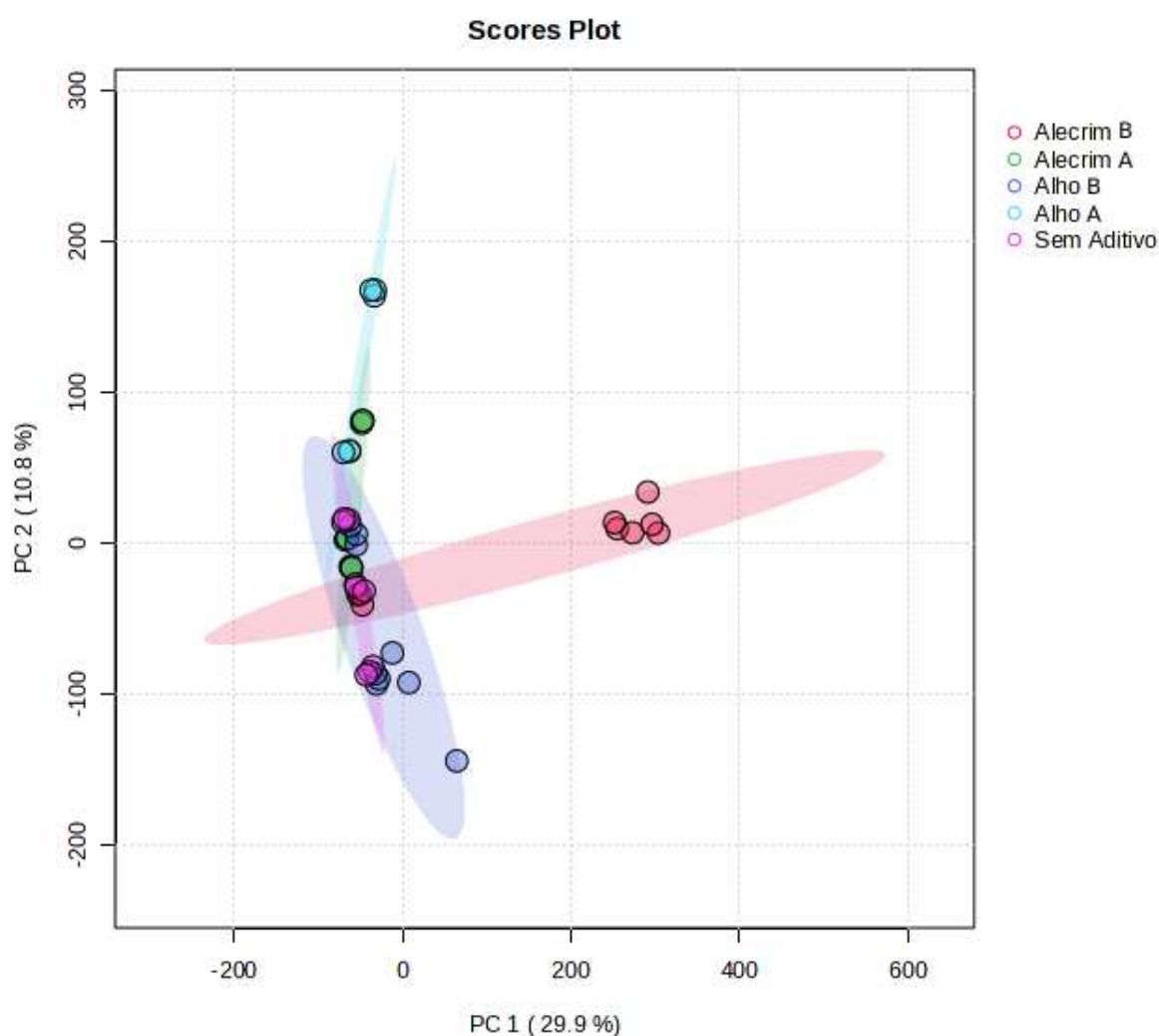
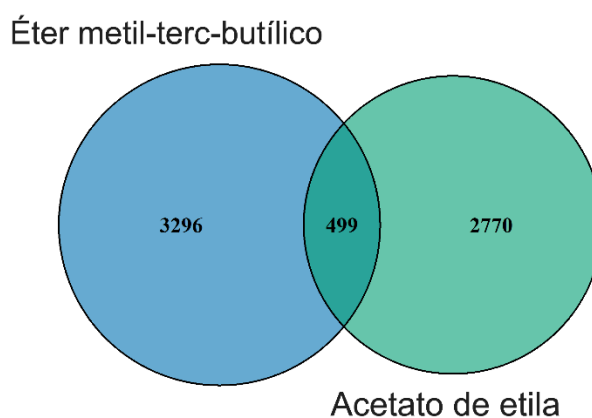


Figura 6. Análise de Componentes Principais (PCA) das amostras extraídas com éter metil-terc-butílico, sem aditivo = sem adição de óleos essenciais; Alho A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alho B = 0,14 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim A = 1,00 mL por litro de líquido ruminal, Alecrim B = 0,40 mL por litro de líquido ruminal.

Na extração com éter metil-terc-butílico, os componentes principais PC1 (29,9 %) e PC2 (10,8 %) explicaram conjuntamente 40,7% da variância, indicando maior capacidade de separação entre os grupos. A dieta Alecrim B se destacou com uma separação clara ao longo do eixo PC1, enquanto os grupos suplementados com óleo

1840 essencial de alho (Alho B e Alho A) apresentaram agrupamentos mais compactos,
1841 embora parcialmente sobrepostos. A dieta sem aditivo, por sua vez, manteve padrão
1842 mais disperso, como observado na extração anterior, o que pode refletir maior
1843 variabilidade na fermentação ruminal em ausência de modulação bioativa.

1844 A comparação entre os dois métodos de extração é apresentada no diagrama
1845 de Venn (Figura 5), no qual se observa a detecção de 3.296 entidades químicas únicas
1846 pela extração com éter metil-terc-butílico e 2.770 pela extração com acetato de etila,
1847 com apenas 499 entidades compartilhadas entre ambas. Esse resultado evidencia a
1848 complementaridade entre os métodos, indicando que cada solvente é capaz de extrair
1849 subconjuntos distintos do metaboloma ruminal, provavelmente em razão de diferenças
1850 na polaridade e seletividade química.



1851

1852 **Figura 7.** Diagrama de Venn compilando entidades químicas extraídas do líquido ruminal de
1853 ovinos, alimentados com dietas contendo ou não óleos essenciais de alho e alecrim, extraídas
1854 com acetato de etila e com éter metil-terc-butílico.

1855 A separação observada entre os grupos dietéticos nas análises de PCA reflete
1856 a ação moduladora dos óleos essenciais sobre o metaboloma ruminal. Compostos
1857 bioativos presentes no óleo de alho (como alicina e dialil dissulfeto) e no óleo de
1858 alecrim (como cineol e carnosol) são conhecidos por exercer efeitos antimicrobianos

seletivos, alterando a microbiota ruminal e influenciando a produção de metabólitos. Dorantes-Iturbide et al., (2022), em meta-análise envolvendo 74 estudos, demonstraram que a inclusão de óleos essenciais em dietas para pequenos ruminantes melhora a digestibilidade da matéria seca, modula o perfil de ácidos graxos voláteis e reduz as concentrações ruminais de amônia e metano, efeitos compatíveis com os padrões observados nas análises multivariadas deste estudo.

Além disso, Cavalheiro Junior et al., (2021) demonstraram, em ensaio *in vitro*, que diferentes concentrações de óleos essenciais de alho e alecrim afetam a cinética de degradação de carboidratos, evidenciando alterações no padrão de fermentação ruminal. Resultados semelhantes também foram relatados por Zhu et al., (2021), que observaram mudanças significativas no metaboloma ruminal e na estrutura da microbiota ruminal de cordeiros alimentados com casca de alho, um subproduto rico em compostos bioativos. A inclusão da casca de alho promoveu alterações em vias metabólicas relacionadas a aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas, além de modular populações bacterianas chave no rúmen, como *Prevotella* e *Ruminococcus*.

Do ponto de vista analítico, os dados aqui obtidos estão em conformidade com as observações de Zuffa et al., (2025), que, ao comparar etanol e metanol como solventes de extração para estudos metabolômico não-direcionados em microbioma intestinal humano, constataram que a escolha do solvente impacta significativamente a composição química detectada, a resolução das análises multivariadas e a interpretação dos dados. Assim como neste estudo, os autores evidenciaram que diferentes solventes favorecem a detecção de metabólitos com características físico-químicas distintas, e que o uso combinado de abordagens pode ampliar a abrangência e a sensibilidade das análises metabolômicas.

CONCLUSÃO

A inclusão do óleo essencial de alecrim na menor dosagem promoveu modulação aparente do metaboloma ruminal, refletida na separação dos grupos nas análises multivariadas e na presença de compostos discriminantes associados ao metabolismo lipídico e proteico. No entanto, o número relativamente pequeno de metabólitos identificados em relação ao total de entidades detectadas indica que são

1889 necessários estudos complementares para aprofundar a compreensão do
1890 metaboloma ruminal sob a influência dos óleos essenciais.

1891 REFERÊNCIAS

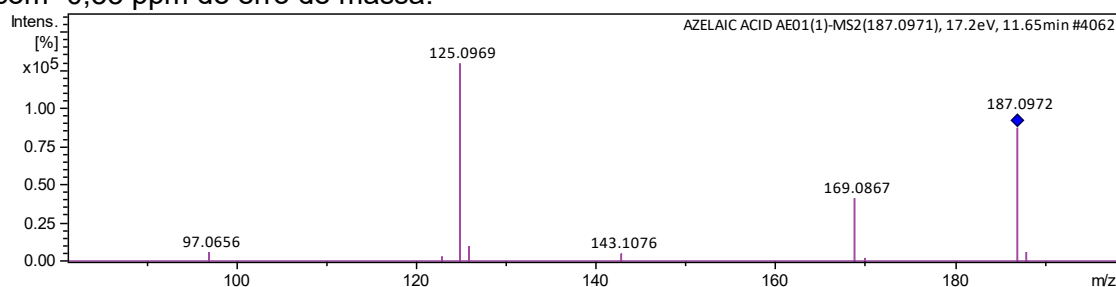
- 1892 BUCCIONI, Arianna *et al.* Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and
1893 biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal**
1894 **Feed Science and Technology**, v. 174, n. 1–2, p. 1–25, jun. 2012.
- 1895 CAVALHEIRO JUNIOR, Elias Rodrigues *et al.* Effect of Supplying Rosemary
1896 (*Rosmarinus officinalis* L.) and Garlic (*Allium sativum* L.) Essential Oils to Feedlot
1897 Lambs on in vitro Ruminant Fermentation. **Frontiers in Animal Science**, v. 2, 2021.
- 1898 CETIN, I. *et al.* The effects of rosemary essential oil supplementation on growth
1899 performance, rumen flora and antioxidant blood parameters in growing Merino lambs.
1900 **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 74, n. 4, p. 6607–6614, 2023.
- 1901 CLEMMONS, Brooke A. *et al.* Rumen fluid metabolomics of beef steers differing in
1902 feed efficiency. **Metabolomics**, v. 16, n. 2, p. 23, 27 fev. 2020.
- 1903 COBELLIS, Gabriella; TRABALZA-MARINUCCI, Massimo; YU, Zhongtang. Critical
1904 evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Science**
1905 **of The Total Environment**, v. 545–546, p. 556–568, 1 mar. 2016.
- 1906 DORANTES-ITURBIDE, Griselda *et al.* Essential Oils as a Dietary Additive for Small
1907 Ruminants: A Meta-Analysis on Performance, Rumen Parameters, Serum Metabolites,
1908 and Product Quality. **Veterinary Sciences** MDPI, , 1 set. 2022.
- 1909 GARCÍA-RODRÍGUEZ, Jairo *et al.* Effects of Garlic Oil and Cinnamaldehyde on Sheep
1910 Rumen Fermentation and Microbial Populations in Rusitec Fermenters in Two Different
1911 Sampling Periods. **Animals**, v. 14, n. 7, p. 1067, 30 mar. 2024.
- 1912 MATYASH, Vitali *et al.* Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput
1913 lipidomics. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 5, p. 1137–1146, maio 2008.
- 1914 NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**.
1915 New York: National Academy of Sciences, 2007.
- 1916 NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. [S.l.]:
1917 W. H. Freeman, 2017.
- 1918 PATRA, Amlan K.; YU, Zhongtang. Effects of Essential Oils on Methane Production
1919 and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations.
1920 **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4271–4280, 15 jun. 2012.
- 1921 RABEE, Alaa Emara *et al.* Effect of garlic powder supplementation on rumen
1922 microbiota and histology, and blood metabolites in Barki lambs. **BMC Veterinary**
1923 **Research**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2025.
- 1924 RANEA-ROBLES, Pablo; HOUTEN, Sander M. The biochemistry and physiology of
1925 long-chain dicarboxylic acid metabolism. **Biochemical Journal**, v. 480, n. 9, p. 607–
1926 627, 15 maio 2023.

- 1927 SALEEM, F. *et al.* A metabolomics approach to uncover the effects of grain diets on
1928 rumen health in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 11, p. 6606–6623,
1929 nov. 2012.
- 1930 SMETI, Samir *et al.* Effects of rosemary essential oil on the milk production and fatty
1931 acid profiles of ewes fed oat hay or silage. **Archives Animal Breeding**, v. 67, n. 2, p.
1932 177–184, 17 abr. 2024.
- 1933 WANDERS, Ronald J. A.; KOMEN, Jasper; KEMP, Stephan. Fatty acid omega-
1934 oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. **The FEBS**
1935 **Journal**, v. 278, n. 2, p. 182–194, 13 jan. 2011.
- 1936 WASTERNAK, C.; HAUSE, B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal
1937 transduction and action in plant stress response, growth and development. An update
1938 to the 2007 review in Annals of Botany. **Annals of Botany**, v. 111, n. 6, p. 1021–1058,
1939 jun. 2013.
- 1940 ZHOU, Xiaokang *et al.* Enteric methane emissions, rumen fermentation, and milk
1941 composition of dairy cows fed 3-nitrooxypropanol and L-malate supplements.
1942 **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, 20 dez. 2024.
- 1943 ZHU, W. *et al.* Garlic skin induces shifts in the rumen microbiome and metabolome of
1944 fattening lambs. **Animal**, v. 15, n. 5, p. 100216, maio 2021.
- 1945 ZUFFA, Simone *et al.* Human Untargeted Metabolomics in High-Throughput Gut
1946 Microbiome Research: Ethanol vs Methanol. **Analytical Chemistry**, v. 97, n. 9, p.
1947 4945–4953, 11 mar. 2025.

1948 ANEXOS

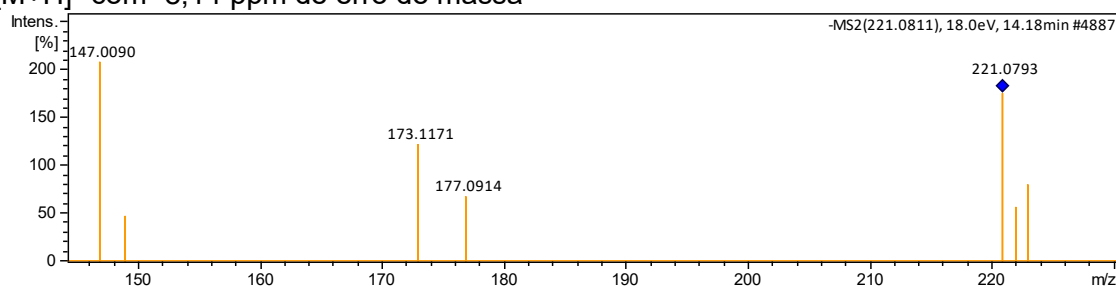
1949 • Anexos: Espectros obtidos por meio de extração acetato de etila modo
1950 negativo

1951 Anexo 1: Espectro de fragmentação do Ácido azelaico. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
1952 com -0,53 ppm de erro de massa.



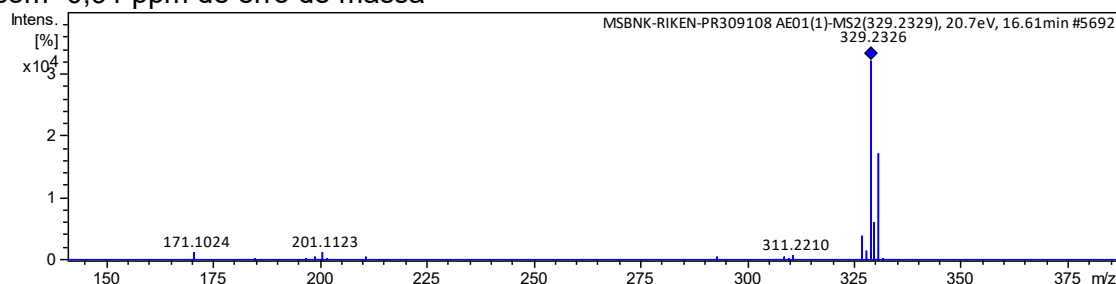
1953

1954 Anexo 2: Espectro de fragmentação do Ácido monoisobutilftálico. O íon foi identificado como
1955 $[M+H]^+$ com -8,14 ppm de erro de massa



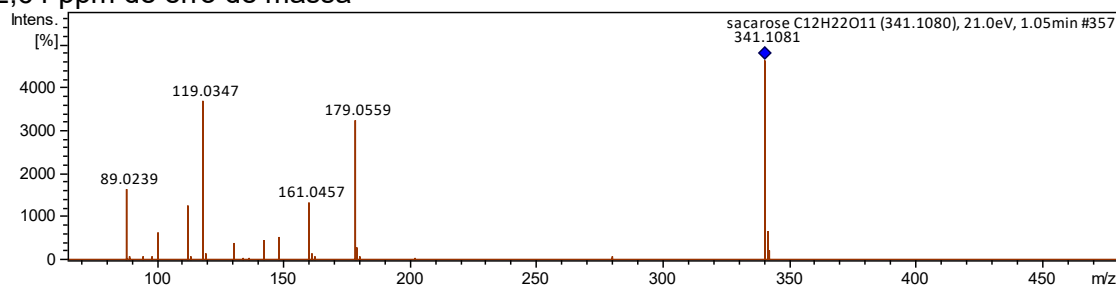
1956

1957 Anexo 3: Espectro de fragmentação do Ácido pinélico. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
1958 com -0,91 ppm de erro de massa



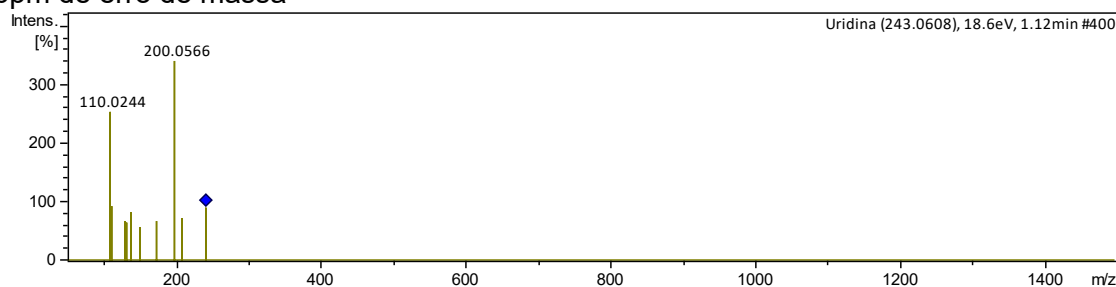
1959

1960 Anexo 4: Espectro de fragmentação da sacarose. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com -
1961 2,64 ppm de erro de massa



1962

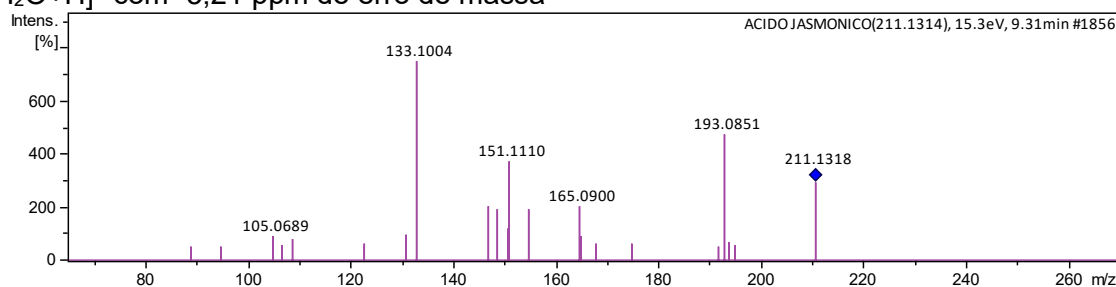
1963 Anexo 5: Espectro de fragmentação da uridina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com -6,17
1964 ppm de erro de massa



1965

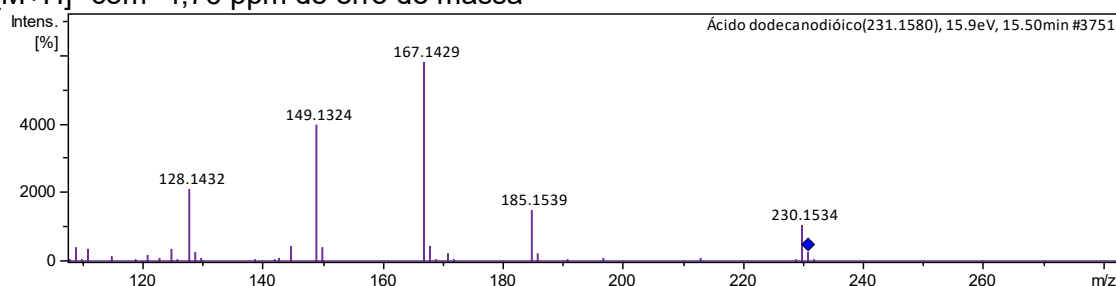
1966 • Anexos: Espectros obtidos por meio de extração acetato de etila modo positivo

1967 Anexo 6: Espectro de fragmentação do Ácido jasmônico. O íon foi identificado como $[M-$
1968 $H_2O+H]^+$ com -5,21 ppm de erro de massa



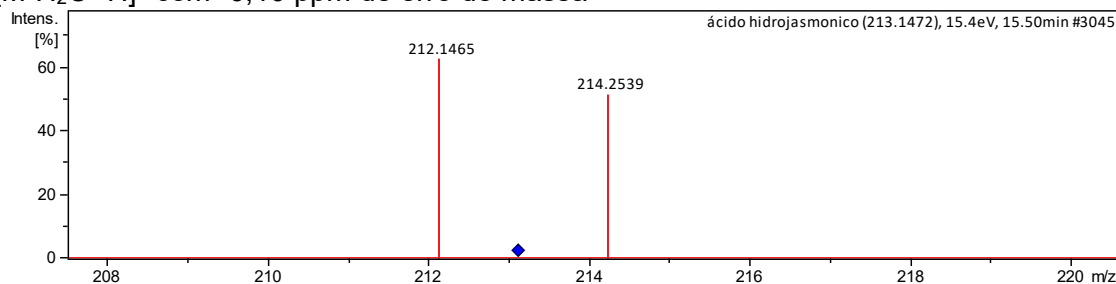
1969

1970 Anexo 7: Espectro de fragmentação do Ácido dodecanodióico. O íon foi identificado como
1971 $[M+H]^+$ com -4,76 ppm de erro de massa



1972

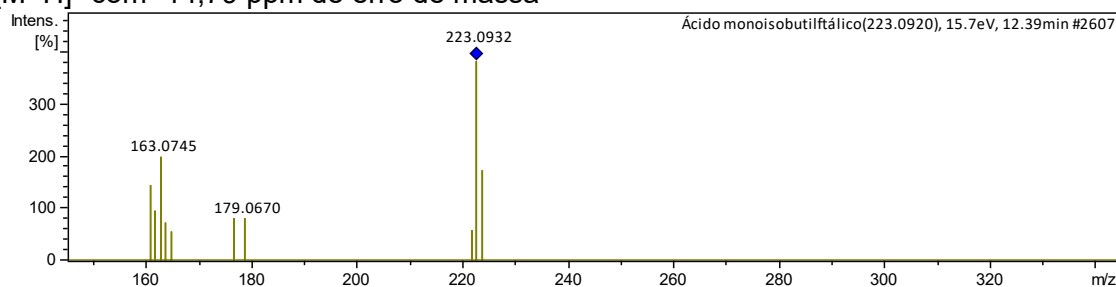
1973 Anexo 8: Espectro de fragmentação do Ácido hidrojasmonico. O íon foi identificado como
1974 $[M-H_2O+H]^+$ com -6,10 ppm de erro de massa



1975

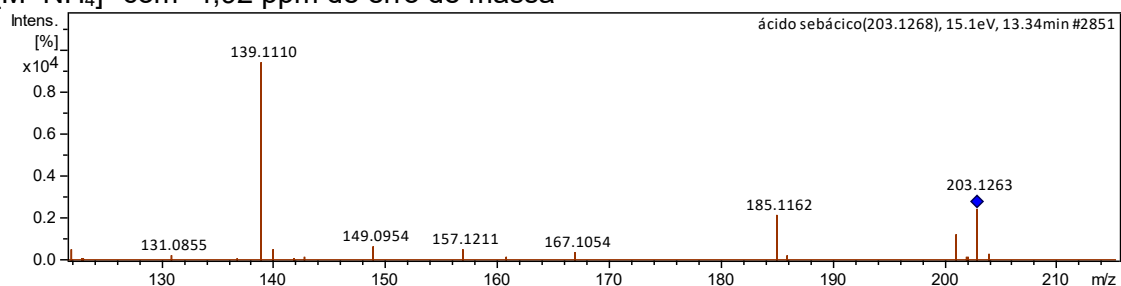
1976 Anexo 9: Espectro de fragmentação do Ácido monoisobutilftálico. O íon foi identificado como
1977 $[M+H]^+$ com -14,79 ppm de erro de massa

1978



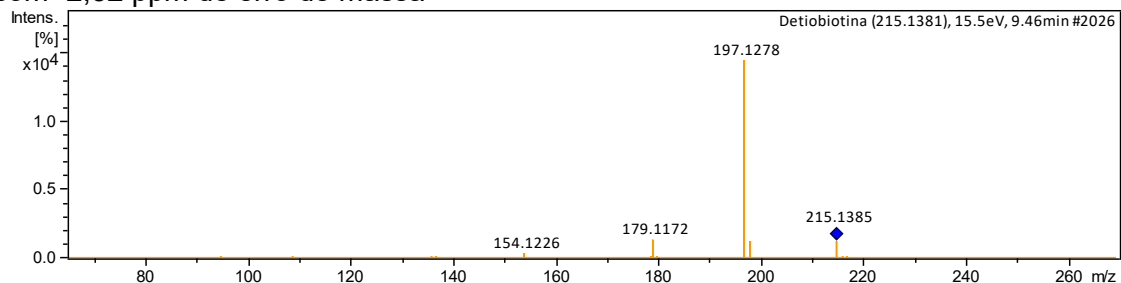
1979 Anexo 10: Espectro de fragmentação do Ácido Sebácico. O íon foi identificado como
1980 $[M+NH_4]^+$ com -4,92 ppm de erro de massa

1981



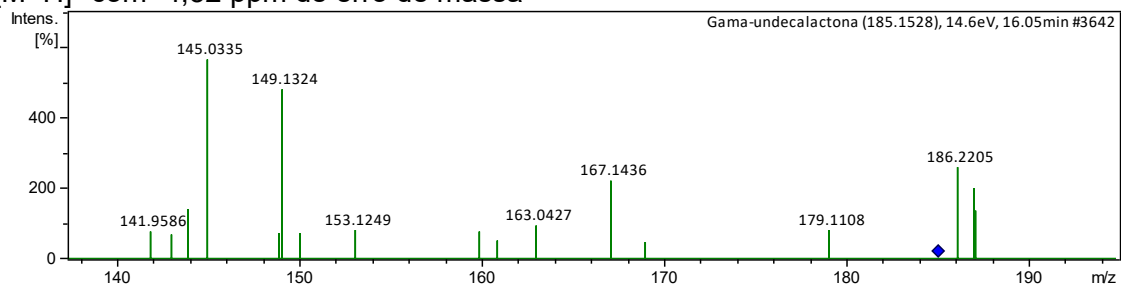
1982 Anexo 11: Espectro de fragmentação da Detiobiotina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
1983 com -2,32 ppm de erro de massa

1984



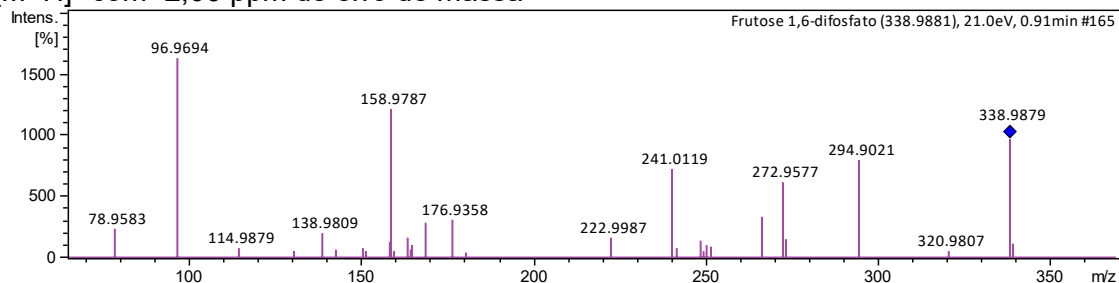
1985 Anexo 12: Espectro de fragmentação da Gama-undecalactona. O íon foi identificado como
1986 $[M+H]^+$ com -4,32 ppm de erro de massa

1987



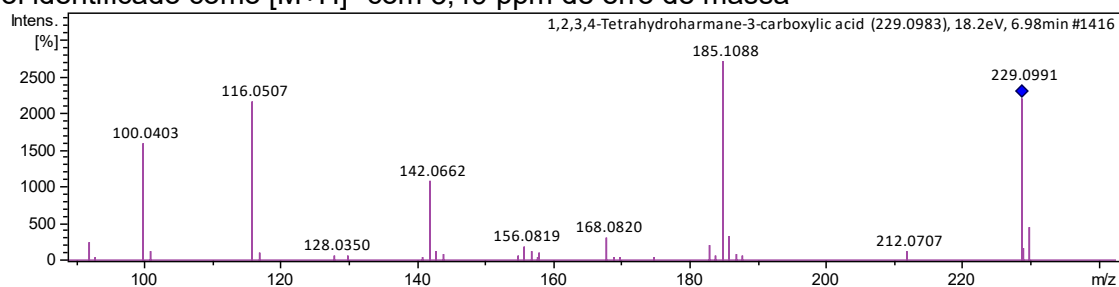
1988 • Anexos: Espectros obtidos por meio de extração Matyash fase aquosa modo negativo

1989 Anexo 13: Espectro de fragmentação da Frutose 1,6-difosfato. O íon foi identificado como
1990 $[M+H]^+$ com -2,06 ppm de erro de massa



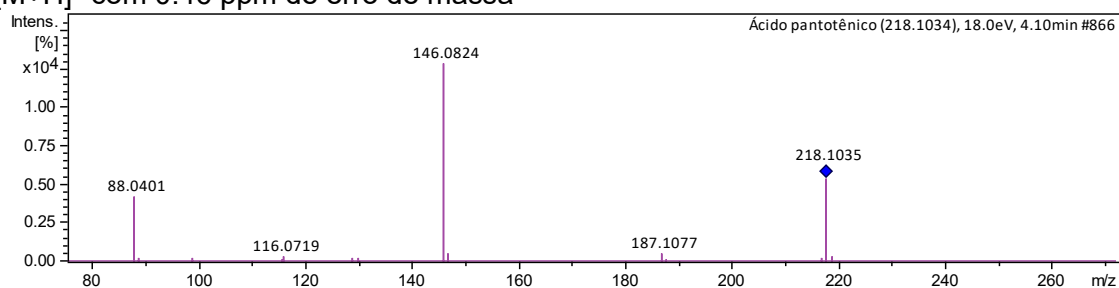
1991

1992 Anexo 14: Espectro de fragmentação da 1,2,3,4-Tetrahydroharmane-3-carboxylic acid. O íon
1993 foi identificado como $[M+H]^+$ com 3,49 ppm de erro de massa



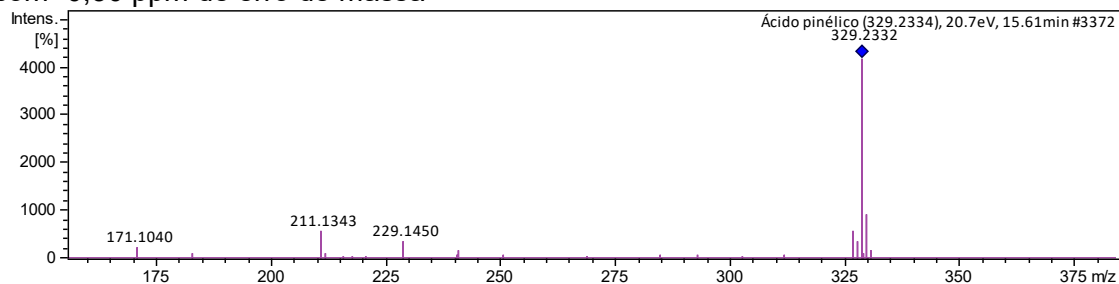
1994

1995 Anexo 15: Espectro de fragmentação do Ácido pantotênico. O íon foi identificado como
1996 $[M+H]^+$ com 0.46 ppm de erro de massa



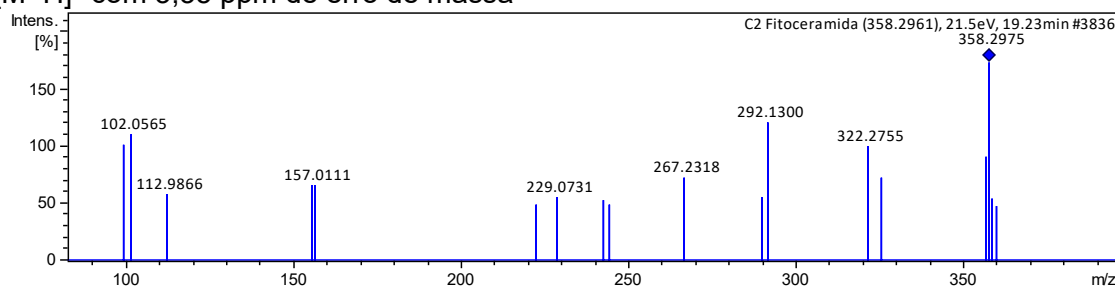
1997

1998 Anexo 16: Espectro de fragmentação do Ácido pinélico. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
1999 com -0,30 ppm de erro de massa



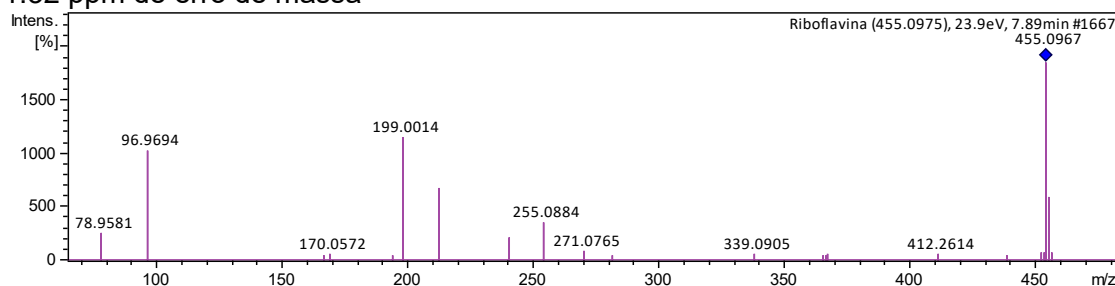
2000

2001 Anexo 17: Espectro de fragmentação do C2 Fitoceramida. O íon foi identificado como
2002 $[M+H]^+$ com 3,35 ppm de erro de massa



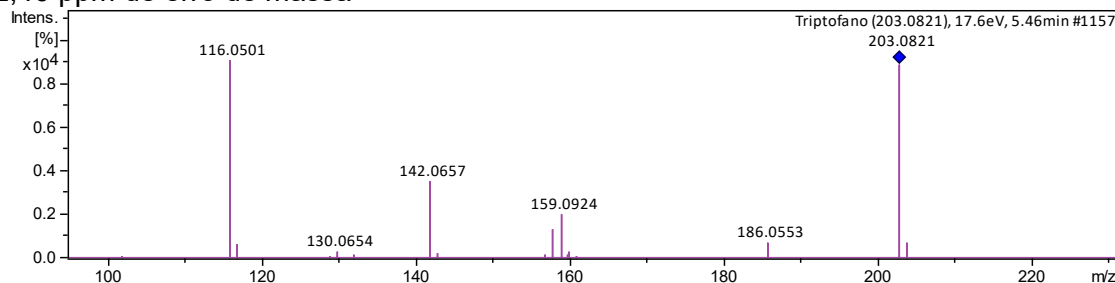
2003

2004 Anexo 18: Espectro de fragmentação da Riboflavina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com
2005 -1.32 ppm de erro de massa



2006

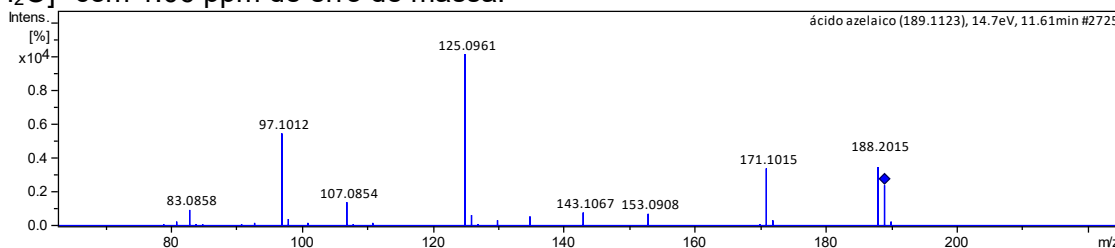
2007 Anexo 19: Espectro de fragmentação do Triptofano. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com -
2008 2,46 ppm de erro de massa



2009

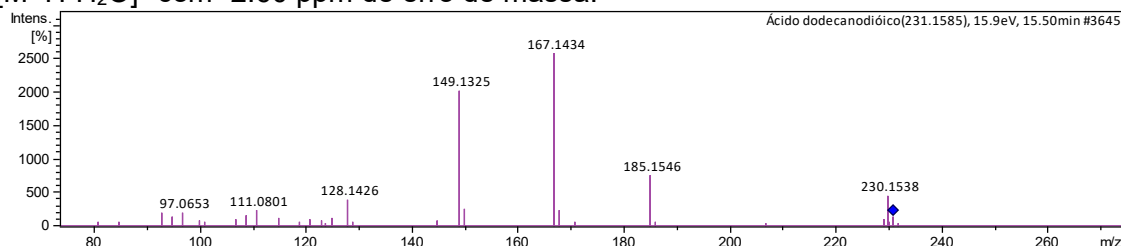
2010 • Anexos: Espectros obtidos por meio de extração Matyash fase aquosa modo positivo

2011 Anexo 20: Espectro de fragmentação do Ácido azelaico. O íon foi identificado como $[M+H-
2012 H_2O]^+$ com 1.06 ppm de erro de massa.

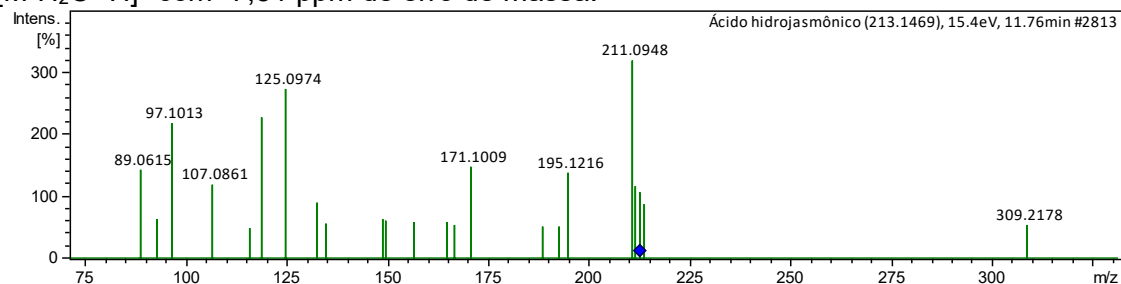


2013

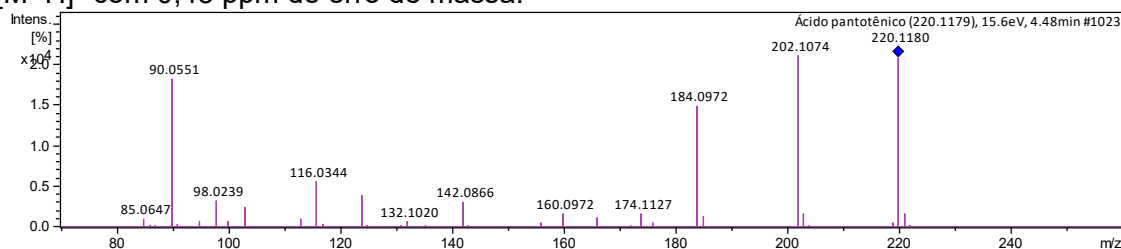
2014 Anexo 21: Espectro de fragmentação do Ácido dodecanodióico. O íon foi identificado como
2015 $[M+H-H_2O]^+$ com -2.60 ppm de erro de massa.



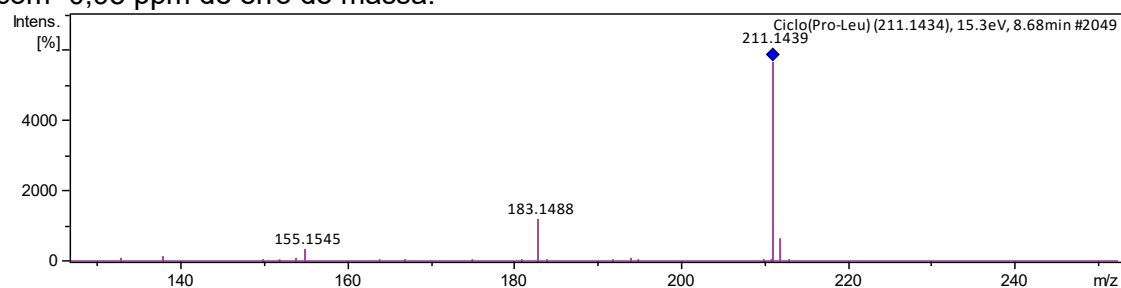
2016 Anexo 22: Espectro de fragmentação do Ácido hidrojasmonico. O íon foi identificado como
2017 $[M-H_2O+H]^+$ com -7,51 ppm de erro de massa.
2018



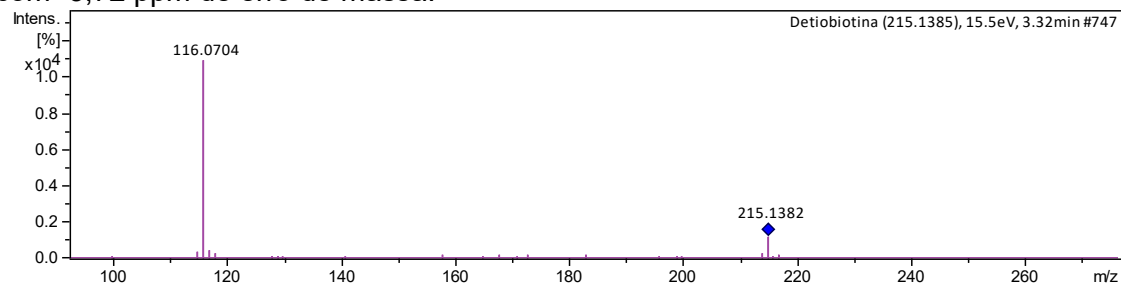
2019 Anexo 23: Espectro de fragmentação do Ácido pantotênico. O íon foi identificado como
2020 $[M+H]^+$ com 0,45 ppm de erro de massa.
2021



2022 Anexo 24: Espectro de fragmentação do Ciclo(Pro-Leu). O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2023 com -0,95 ppm de erro de massa.
2024

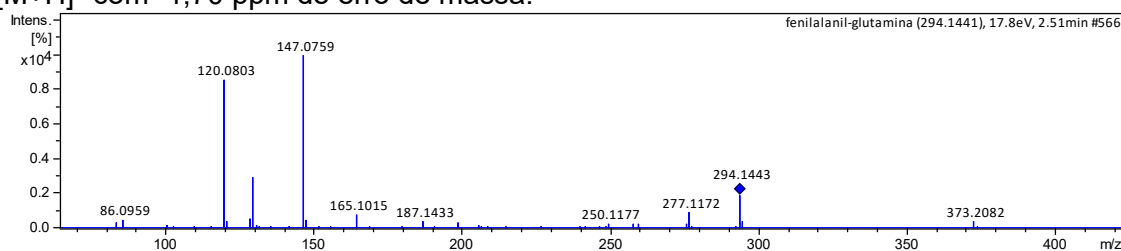


2025 Anexo 25: Espectro de fragmentação da Detiobiotina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2026 com -3,72 ppm de erro de massa.
2027

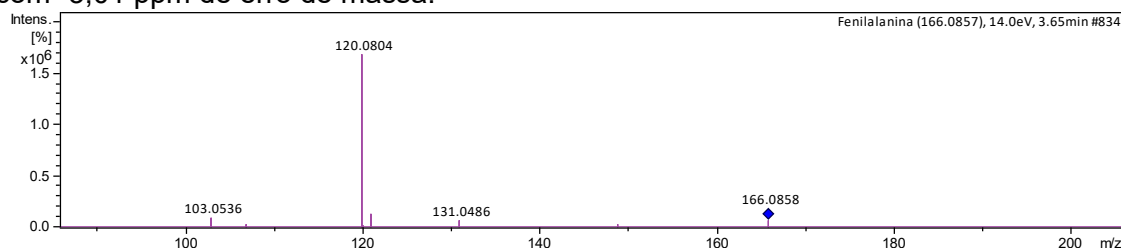


2028

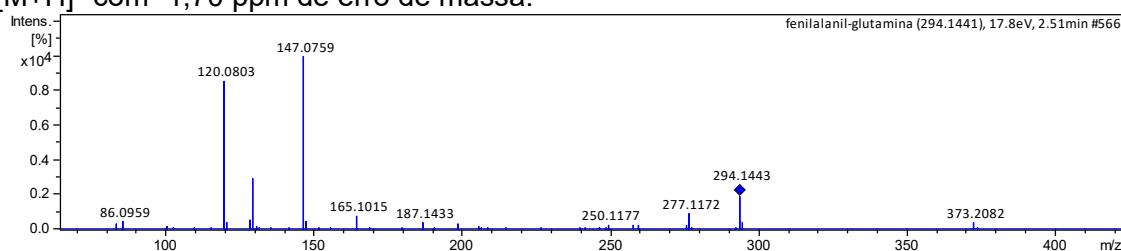
2029 Anexo 26: Espectro de fragmentação da fenilalanil-glutamina. O íon foi identificado como
2030 $[M+H]^+$ com -1,70 ppm de erro de massa.



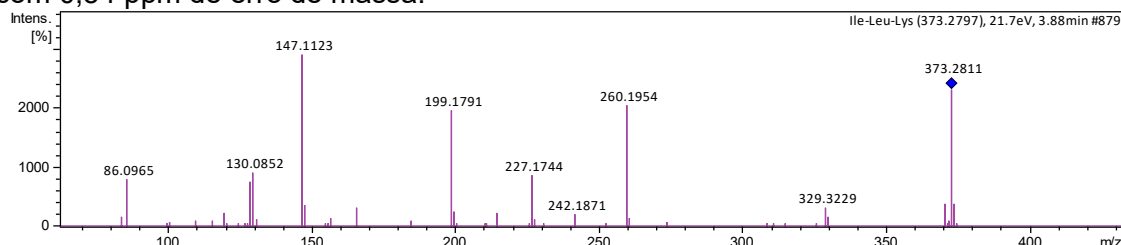
2031 Anexo 27: Espectro de fragmentação da Fenilalanina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2032 com -3,01 ppm de erro de massa.
2033



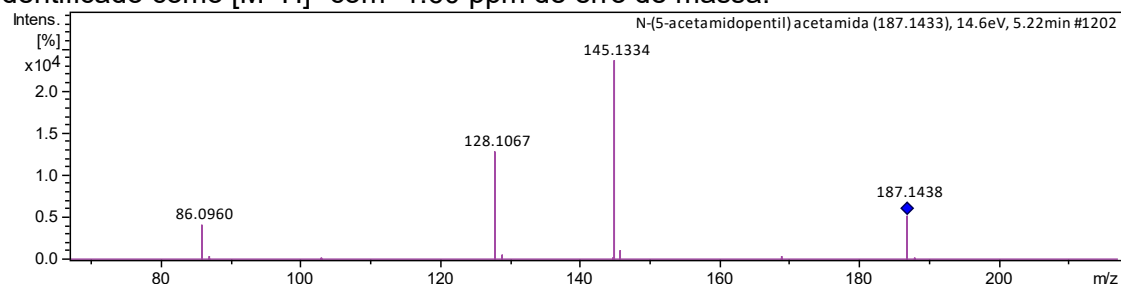
2034 Anexo 28: Espectro de fragmentação da fenilalanil-glutamina. O íon foi identificado como
2035 $[M+H]^+$ com -1,70 ppm de erro de massa.
2036



2037 Anexo 29: Espectro de fragmentação da Ile-Leu-Lys. O íon foi identificado como $[M+2H]^+$
2038 com 0,54 ppm de erro de massa.
2039

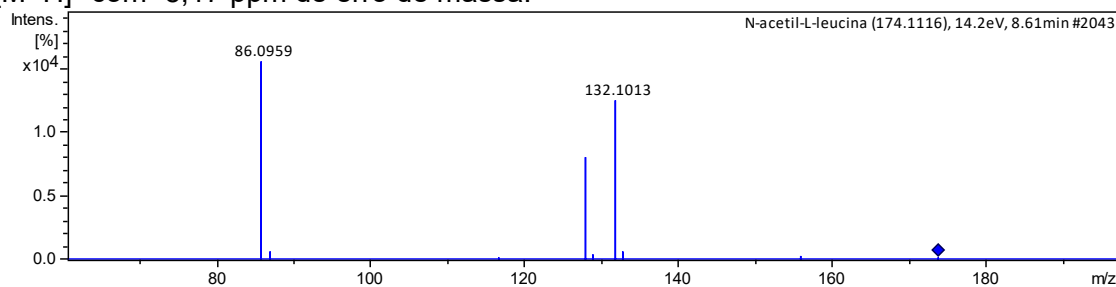


2040 Anexo 30: Espectro de fragmentação da N-(5-acetamidopentil) acetamida. O íon foi
2041 identificado como $[M+H]^+$ com -1.60 ppm de erro de massa.
2042

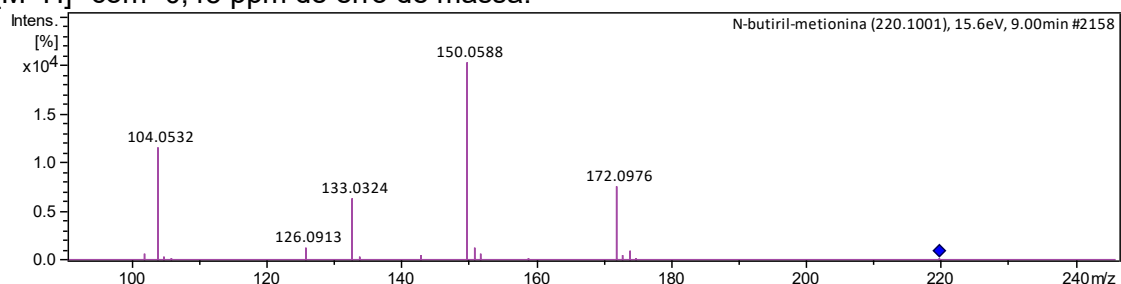


2043

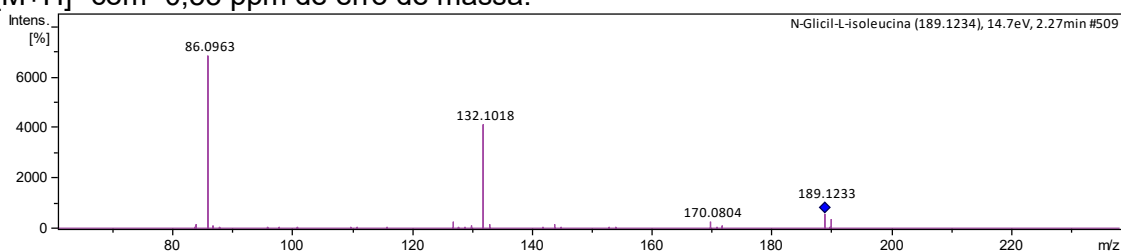
2044 Anexo 31: Espectro de fragmentação da N-acetil-L-leucina. O íon foi identificado como
2045 $[M+H]^+$ com -5,17 ppm de erro de massa.



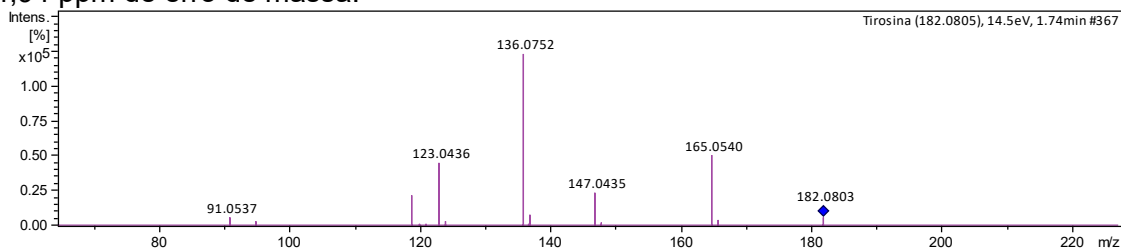
2046 Anexo 32: Espectro de fragmentação da N-butiril-metionina. O íon foi identificado como
2047 $[M+H]^+$ com -0,45 ppm de erro de massa.
2048



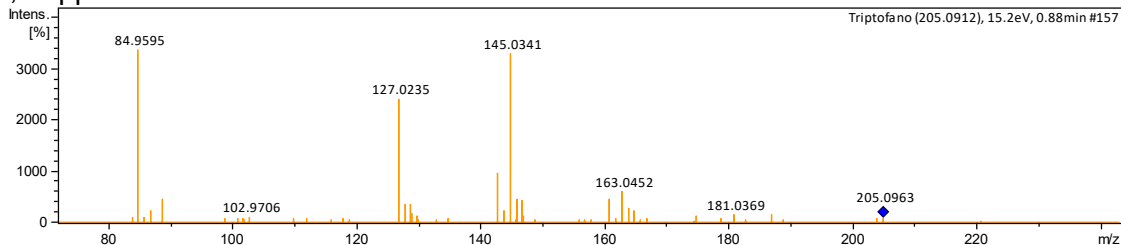
2049 Anexo 33: Espectro de fragmentação da N-Glicil-L-isoleucina. O íon foi identificado como
2050 $[M+H]^+$ com -0,53 ppm de erro de massa.
2051



2052 Anexo 34: Espectro de fragmentação da Tirosina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com -
2053 4,94 ppm de erro de massa.
2054



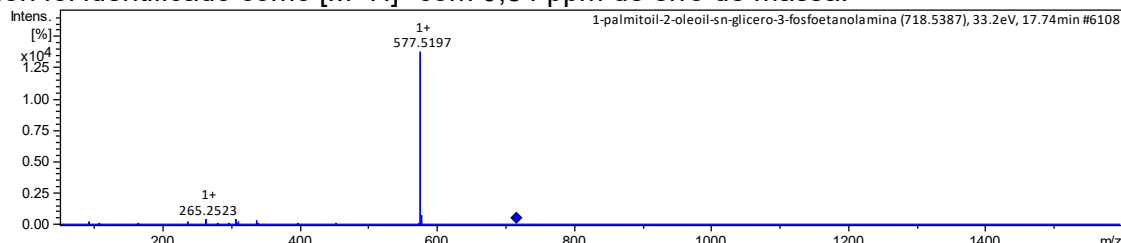
2055 Anexo 35: Espectro de fragmentação do Triptofano. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com -
2056 4,39 ppm de erro de massa.
2057



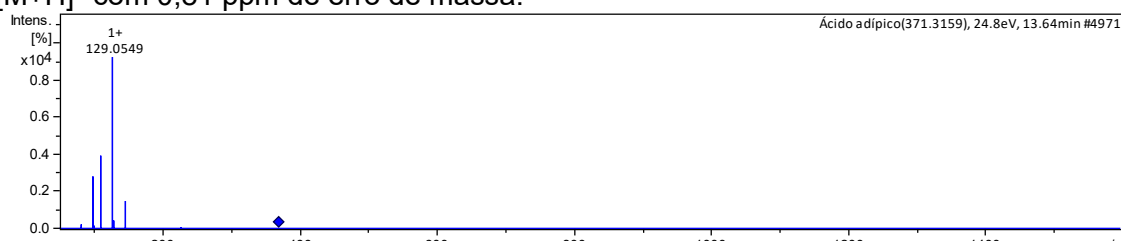
2058

- 2059 • Anexos: Espectros obtidos por meio de extração Matyash fase orgânica (MTBE) modo
2060 positivo

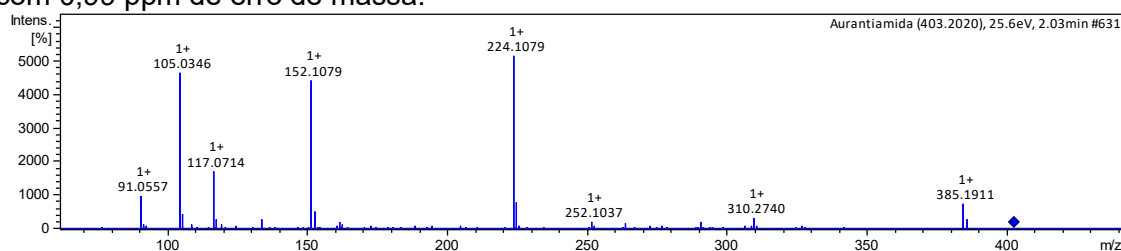
2061 Anexo 36: Espectro de fragmentação do 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina. O
2062 íon foi identificado como $[M+H]^+$ com 0,84 ppm de erro de massa.



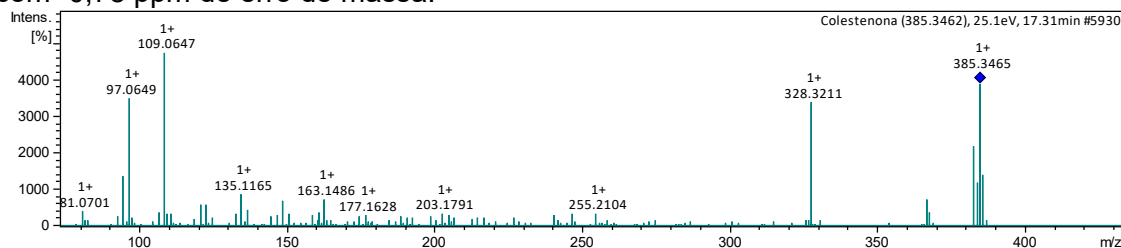
2063 Anexo 37: Espectro de fragmentação do ácido dicarboxílico. O íon foi identificado como
2064 $[M+H]^+$ com 0,81 ppm de erro de massa.
2065



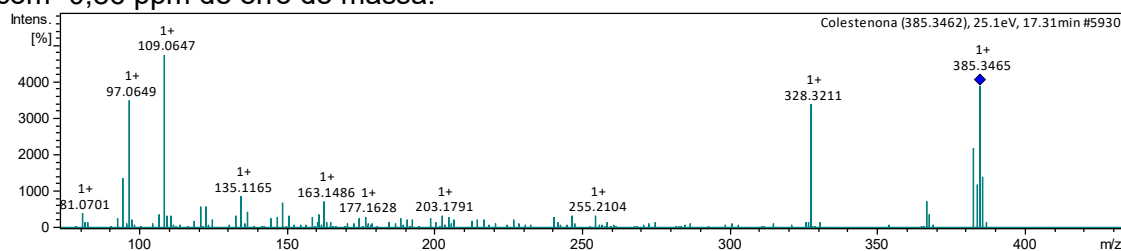
2066 Anexo 38: Espectro de fragmentação da Aurantiamida. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2067 com 0,99 ppm de erro de massa.
2068



2069 Anexo 39: Espectro de fragmentação da Colestenona. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2070 com -0,78 ppm de erro de massa.
2071

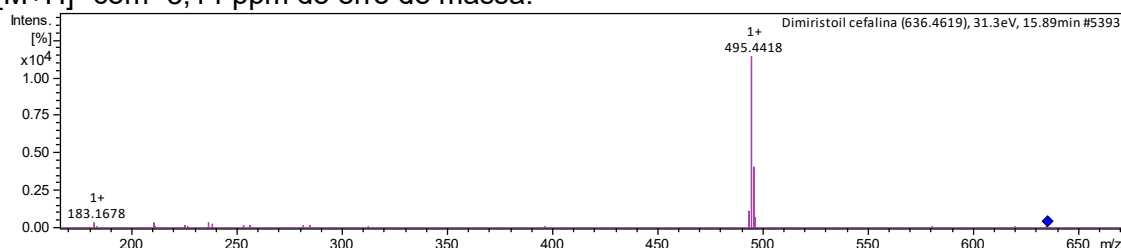


2072 Anexo 40: Espectro de fragmentação do Costunolide. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2073 com -0,86 ppm de erro de massa.
2074

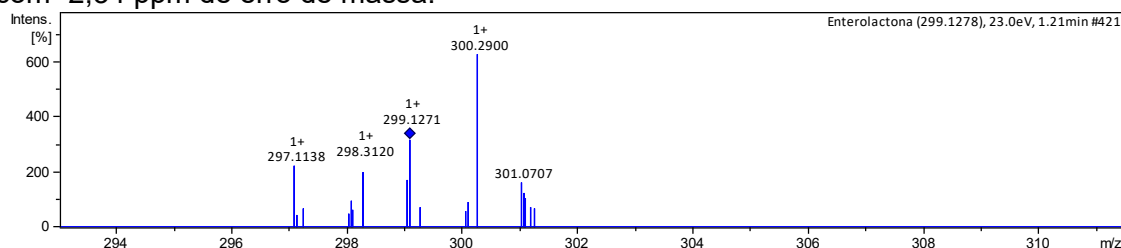


2075

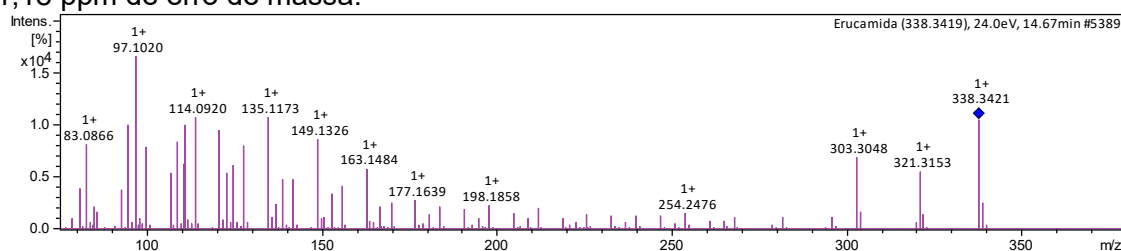
2076 Anexo 41: Espectro de fragmentação do Dimiristoil cefalina. O íon foi identificado como
2077 $[M+H]^+$ com -3,14 ppm de erro de massa.



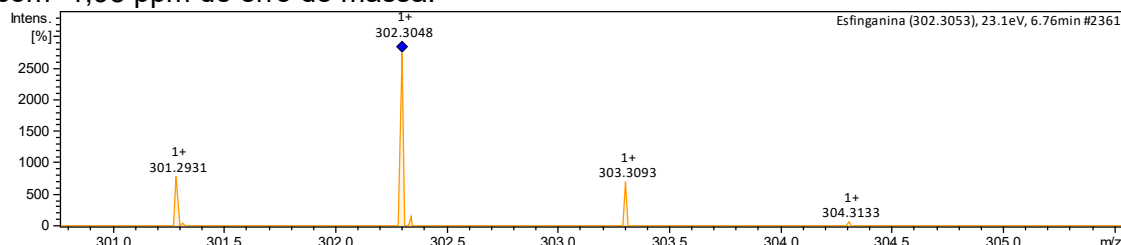
2078 Anexo 42: Espectro de fragmentação da Enterolactona. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2079 com -2,34 ppm de erro de massa.
2080



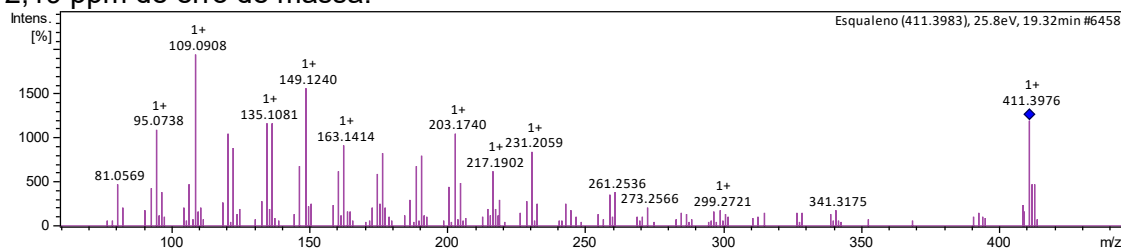
2081 Anexo 43: Espectro de fragmentação da Erucamida. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com
2082 1,18 ppm de erro de massa.
2083



2084 Anexo 44: Espectro de fragmentação da Esfinganina. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2085 com -1,98 ppm de erro de massa.
2086

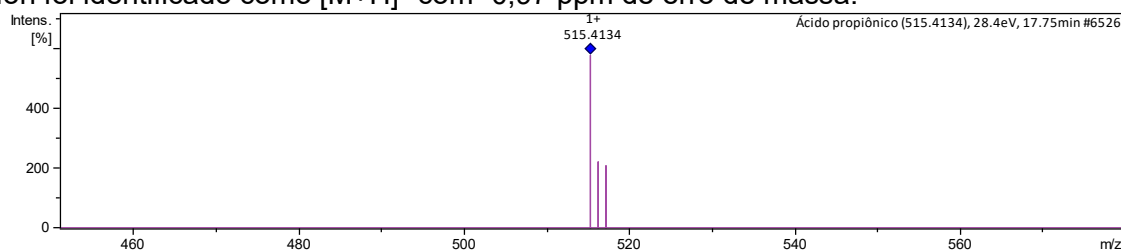


2087 Anexo 45: Espectro de fragmentação do Esqualeno. O íon foi identificado como $[M+H]^+$ com
2088 -2,19 ppm de erro de massa.
2089

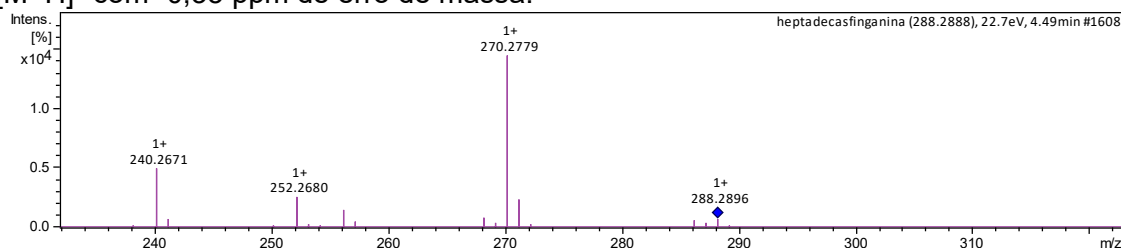


2090

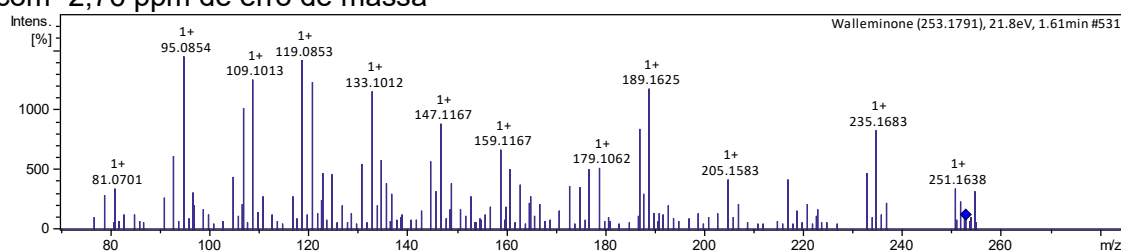
2091 Anexo 46: Espectro de fragmentação do Éster didodecílico do ácido tio-bis-propanoico. O
2092 íon foi identificado como $[M+H]^+$ com -0,97 ppm de erro de massa.



2093 Anexo 47: Espectro de fragmentação da heptadecasfingarina. O íon foi identificado como
2094 $[M+H]^+$ com -0,35 ppm de erro de massa.
2095



2096 Anexo 48: Espectro de fragmentação da Wallemione. O íon foi identificado como $[M+H]^+$
2097 com -2,76 ppm de erro de massa
2098



2099