

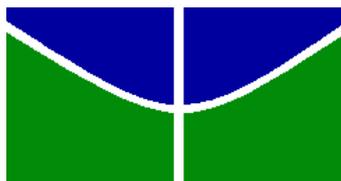
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS PARA
MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMINANTES**

CAMILA EUFRASIO DE SOUZA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA-DF
JULHO/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS PARA
MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMINANTES**

CAMILA EUFRASIO DE SOUZA

ORIENTADOR: SERGIO LÚCIO SALOMON CABRAL FILHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 111/2014

BRASÍLIA-DF
JULHO/2014

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS PARA
MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMINANTES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS
DA FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA DA UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, COMO
PARTE DOS REQUISITOS PARA OBTENÇÃO DE GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**SERGIO LÚCIO SALOMON CABRAL FILHO, Doutor. (UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA) (ORIENTADOR)**

**CLAYTON QUIRINO MENDES, Doutor. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**ROBERTO GUIMARÃES JÚNIOR, Doutor. (EMBRAPA CERRADOS)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 04 Julho de 2014

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOUZA, C.E. **Utilização de compostos secundários de plantas para mitigação de metano em ruminantes.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 86p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta Dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do programa. O autor e sua orientadora reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SOUZA, C.E. **Utilização de compostos secundários de plantas para mitigação de metano em ruminantes.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.

1. Metabólitos secundários. 2. Resveratrol. 3. Tanino. 4. Timol. 5. Óleos essenciais.

I. CABRAL FILHO, S.L.S. II. Título.

DEDICATÓRIA

“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus,
o meu refúgio, a minha fortaleza,
e Nele confiarei.”
(Sl 91:2)

Aos meus queridos pais
José Alves e Aparecida Eufrasio,
pelo apoio aos meus estudos;
paciência e incentivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por mais uma vez permitir que meu objetivo fosse alcançado e nunca me abandonar.
Aos meus pais José e Aparecida, e à minha irmã Graziela, pela paciência e força nos estudos.
Amo muito vocês!

Ao querido orientador Sérgio Lucio, pela grande contribuição à minha formação profissional e pessoal, e pelos conhecimentos passados. Obrigada pela paciência, apoio e constante ajuda, que me ensinaram muito.

Ao dr. Roberto Guimarães, pela simpatia, boa vontade, disposição e conhecimentos passados com sua organização e experiência. Obrigada por me aguentar!

Aos novos amigos que surgiram: Cris, Fred, Geovana, Taís, Tiago, Zezão. A todos muito obrigada pela amizade, companhia, confiança e compartilhamento de problemas e ideias.

Um agradecimento enorme e especial à Renata e Giovana, que surgiram na minha vida para me fazerem rir, crescer pessoalmente e me sentir confortável em ser eu mesma. Foram mais que essenciais na minha formação pessoal e acadêmica!

A CAPES, pela bolsa de estudos fornecida durante os dois anos, sem a qual esse trabalho não seria possível.

As instituições UnB, Rural Development Administration (RDA), Embrapa Cerrados, Embrapa Gado de Leite; CNPq; FAPEMIG; ao Grupo RumenGases; e aos pesquisadores Sang Ho Kim e Luiz Gustavo, os quais possibilitaram a realização dos experimentos e das análises laboratoriais. A todas eles meu muito obrigado.

Aos funcionários do Laboratório de Química Analítica de Plantas e demais laboratórios da Embrapa Cerrados: Sr. Chico, Darlan, Vildeirete e Luciano Almeida. Obrigada por sempre dedicarem parte do tempo de vocês para ensinar e auxiliar; foram fundamentais na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos, em especial prof. Borgo e Márcio. Obrigada por sempre cederem o espaço e o tempo de vocês.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Meio ambiente <i>versus</i> produção de ruminantes	4
2.2. Produção animal a pasto	6
2.3. Metabólitos secundários de plantas	8
2.3.1. Óleos essenciais	10
2.3.2. Propriedades antimicrobianas e modo de ação dos metabólitos secundários ...	10
<i>Monoterpenos fenólicos e compostos fenólicos</i>	12
<i>Fenilpropanóide</i>	13
<i>Compostos organossulfurados</i>	14
<i>Taninos</i>	16
2.4. Principais produtos da fermentação ruminal	17
2.4.1 Ácidos graxos voláteis (AGV)	18
2.4.2 Proteína microbiana	19
2.4.3. Metano	20
<i>Ingestão de alimento e tipo de alimento</i>	21
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 2	31
RESUMO	31
ABSTRACT	33
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4. CONCLUSÕES	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

CAPÍTULO 3.....	58
RESUMO	58
ABSTRACT	60
1.INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4. CONCLUSÕES	72
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

RESUMO

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS PARA MITIGAÇÃO DE METANO EM RUMINANTES

ALUNA: Camila Eufrazio de Souza¹

ORIENTADOR: Dr. Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho¹

¹ Universidade de Brasília - UnB

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito *in vitro* de metabólitos secundários de plantas no volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada (VCH₄/DIVMS), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV). Foram realizados três experimentos, conduzidos no Laboratório Química Analítica de Plantas (LQAP) da Embrapa Cerrados. O meio de cultura foi preparado seguindo-se as recomendações de Theodorou et al. (1994). A mensuração dos gases produzidos foi realizada às 6 e às 24 horas após o início dos experimentos, pelo deslocamento de água medido pelo aparato de vasos comunicantes. DIVMS foi determinada às 24 h. Amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e concentrado foram pesadas na relação 80:20 em sacos F57 da Ankom[®] e foram usadas como tratamento controle (TC) para os experimentos 1 e 2. Para o experimento 3, somente amostras de *B. brizantha* cv. Marandu foram usadas como controle (TC). O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos e três repetições e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. No experimento 1 foi avaliado duas doses (0,3 e 0,6 mL/L de solução) de óleo essencial de alho (A3, A6), canela (C3, C6) e orégano (O3, O6) e duas doses (300 e 600 mg/L de solução) de timol (T3, T6) e resveratrol (R3, R6) em pó. Para VCH₄ todos os tratamentos diferiram (P<0,05) de TC, reduzindo o volume produzido. R6 não diferiu (P>0,05) de TC para DIVMS, sendo que todos os outros tratamentos aumentaram (P<0,05) DIVMS. A relação VCH₄/DIVMS foi reduzida (P<0,05) com a adição dos metabólitos. A concentração de N-NH₃ não foi alterada por nenhum dos metabólitos avaliados. As concentrações dos ácidos acético, propiônico e soma AGV não foram alteradas pelo tratamento R3, tendo todos os outros reduzido (P<0,05) a concentração de ambos os ácidos, o que evidencia o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais sobre os micro-organismos ruminais. No experimento 2 foram avaliadas as combinações entre 300 e 600 mg/L de resveratrol com 0,6 mL/L dos óleos essenciais de alho

(R3A6, R6A6), canela (R3C6, R6C6) e orégano (R3O6, R6O6), e 600 mg/L de timol (R3T6, R6T6). Também foi avaliada a dose de 0,6 mL/L de todos os metabólitos sem associação com resveratrol (A6, C6, O6, T6, R6) e a menor dose de resveratrol (R3). O VCH₄ e a DIVMS reduziram ($P < 0,05$) em relação à TC para todos os tratamentos combinados ou não com o resveratrol, mas não houve efeito ($P > 0,05$) para os tratamentos R3 e R6. O VCH₄/DIVMS também foi reduzido ($P < 0,05$) em relação à TC para todos os tratamentos. A concentração de N-NH₃ foi reduzida ($P < 0,05$) para os tratamentos R6, R6A6 e R6T6. Os tratamentos A6, C6, O6 e R3C6 aumentaram ($P < 0,05$) a concentração de N-NH₃. Não houve efeito, em relação à TC, na concentração de acetato, butirato e soma de AGV para os tratamentos combinados com o resveratrol, à exceção de R3C6, indicando que tais aditivos podem ser usados para melhorar a eficiência do uso da dieta de ruminantes com efeito tóxico sobre os microrganismos metanogênicos. O experimento 3 avaliou o efeito de extratos de plantas do cerrado, barbatimão e sucupira, nos mesmos parâmetros citados acima. Amostras de *Brachiaria brizantha* foram usadas como controle (Br). As doses avaliadas foram 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L de solução para barbatimão (B100, B200, B300, B400 e B600) e para sucupira (S100, S200, S300, S400 e S600). Para VCH₄, B300, B600, S300 e S400 mg/L, diferiram ($P < 0,05$) de Br. Nenhum tratamento teve influência na DIVMS. A relação VCH₄/DIVMS aumentou ($P < 0,05$) em 33,8% para S300. A concentração de N-NH₃ aumentou ($P < 0,05$) para S400 e S600. Em relação à concentração do AGV, B100 e S300 mg/L reduziram ($P < 0,05$) a concentração de ácido acético, porém S400 aumentou ($P < 0,05$) em 21% a concentração desse ácido. Os tratamentos não diferiram estatisticamente de Br para o ácido propiônico. Os tratamentos reduziram ($P < 0,05$) a concentração de ácido butírico entre 37,6 e 76,4%. A soma de AGV também reduziu significativamente ($P < 0,05$) para todos os tratamentos com extrato de barbatimão e sucupira, a exceção do tratamento S400. Os tratamentos com extrato de barbatimão provocaram queda na produção de CH₄, porém reduziram a SAGV, o que mostra que tal extrato, nas doses avaliadas, não é recomendado para melhorar a eficiência de uso da dieta por bovinos. Os tratamentos com extrato de sucupira apresentaram variação nos resultados dos parâmetros avaliados nesse experimento. Mais estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos desse extrato sobre os parâmetros de fermentação ruminal.

Palavras-chaves: metabólitos secundários de plantas, óleos essenciais, produção de gás *in vitro*, resveratrol

ABSTRACT

USE OF SECONDARY METABOLITES OF PLANTS FOR MITIGATION METHANE IN RUMINANTES

GRADUATE STUDENT: Camila Eufrasio de Souza¹

TUTOR: Prof. Dc. Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho¹

¹ Universidade de Brasília - UnB

The objective of this study was to evaluate in vitro effect of plant secondary metabolites on the volume of methane (VCH₄), in vitro dry matter degradability (IVDMD), volume of methane per gram of degraded dry matter (VCH₄/IVDMD), ammonia concentration (N-NH₃) and volatile fatty acids (VFA). The incubation medium was prepared following the recommendations of Theodorou et al. (1994). In vitro gas production was performed by the use of a simple apparatus for measuring gas production through communicating vessels and methane concentration was determined by gas chromatography. IVDMD were determined at 24 h. Samples of *Brachiaria brizantha* and concentrate were weighed in the ratio 80:20 into Ankom[®] filter bags (F57) and were used as the control treatment (TC) for experiments 1 and 2. For experiment 3 only *B. brizantha* was used as control (Br). In Experiment 1 it was evaluated two doses (0.3 and 0.6 mL/L solution) of cinnamon (C3, C6), garlic (A3, A6) and oregano (O3, O6) essential oils and two doses (300 and 600 mg/L solution) of, thymol (T3, T6) and resveratrol (R3, R6) powder. All treatments differed (P<0.05) from TC for VCH₄, reducing the volume produced. R6 did not differ (P>0.05) for IVDMD compared to TC, but all the others treatments increased (P<0.05) IVDMD. The VCH₄/IVDMD ratio was reduced (P<0.05) with the addition of the secondary metabolites. N-NH₃ concentration was not altered by any of the metabolites evaluated. The concentrations of acetic, propionic and total VFA acids were not altered by treatment R3, while all others reduced (P<0.05) the concentration of both acids, which shows the antimicrobial effect of essential oils on rumen microorganisms. In experiment 2, the combinations between 300 and 600 mg/L of resveratrol with 0.6 mL/L of cinnamon (R3C6, R6C6), garlic (R3A6, R6A6) and oregano (R3O6, R6O6) essential oils and with 600 mg/L thymol (R3T6, R6T6) were evaluated. 0.6 mL/L of all metabolites without association with resveratrol (A6, C6, O6, T6, R6) and the lowest dose of resveratrol (R3) were also evaluated. The VCH₄ and IVDMD decreased (P<0.05) compared to TC for all treatments combined or not with resveratrol, but there was no effect (P>0.05) for R3 and R6 treatments.

The VCH₄/IVDMD was also reduced ($P<0.05$) compared to TC for all treatments. The N-NH₃ concentration was reduced ($P<0.05$) for R6, R6A6 and R6T6 treatments. The C6, A6, O6 and R3C6 treatments increased ($P<0.05$) the concentration of N-NH₃. Compared to TC, there was no effect in acetate, butyrate and the sum of VFA concentrations combined with resveratrol, with the exception of R3C6 treatments, indicating that such additives can be used to improve efficiency of feed utilization by ruminants, with toxic effect on the methanogenic microorganisms. Experiment 3 tested doses were 100, 200, 300, 400 and 600 mg/L of solution for barbatimão (B100, B200, B300, B400 and B600) and sucupira (S100, S200, S300, S400 and S600). Treatments B300, B600, S300 and S400 mg/L differed ($P<0.05$) from Br to VCH₄. IVDMD was not affected. The VCH₄/DIVMS ratio increased ($P<0.05$) in 33.8% for S300. The N-NH₃ concentration increased ($P<0.05$) to S400 and S600. S300 and B100 reduced ($P<0.05$) acetic concentration, however S400 increased ($P<0.05$) in 21% the concentration of this acid. The treatments did not differ statistically from Br to propionic acid. The treatments reduced ($P<0.05$) butyric acid concentration from 37.6 to 76.4%. The sum of VFA also reduced ($P<0.05$) for both barbatimão and sucupira treatments, except to S400 treatment. Treatments with barbatimão extract caused decreased in CH₄ production, but reduced SVFA, which shows that this extract in the doses evaluated, it is not recommended to improve the efficiency of use of the diet for cattle. Treatment with extract sucupira showed variation in the results of the parameters evaluated in this experiment. More studies should be conducted to elucidate the effects of this extract on ruminal fermentation.

Keywords: plant secondary metabolites, essential oils, in vitro gas production, tannins

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

No Brasil há, aproximadamente, 170 milhões de hectares de pastagens (Fonseca et al., 2010), que suportam cerca de 205 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2006), constituindo-se na base de sustentação da pecuária de corte brasileira e a fonte mais barata de alimento (Silva, 2009). Contudo, nem sempre a forragem disponível apresenta a quantidade de nutrientes essenciais na proporção adequada que seja o suficiente para atender às exigências dos animais em pastejo (Reis et al., 2006). Sendo assim, a suplementação alimentar faz-se necessária não só para o atendimento às exigências nutricionais, mas também para aumento de produtividade, visando o aumento da eficiência de produção (Silva, 2009). Para isso, é necessário que as pastagens sejam corretamente manejadas para evitar o processo de degradação e, assim, permitir o aumento da competitividade pelo setor pecuário e a preservação ambiental (Kluthcouski & Yokoyama, 2003).

Além da preservação das pastagens, a preocupação ambiental que envolve o setor de criação de bovinos, também está relacionada com as emissões de gás metano provenientes da fermentação entérica e da produção de esterco (Wittenberg, 2008). O metano (CH_4) é um subproduto da fermentação ruminal e, ao ser produzido, viabiliza o funcionamento do rúmen por servir como o principal utilizador de hidrogênio e permitir o correto funcionamento dos sistemas enzimáticos (Moss, 2010). No entanto, a produção desse gás representa perda de energia para produção animal e as ações para reduzir sua emissão são benéficas tanto para o setor produtivo quanto para o meio ambiente, pois uma unidade de CH_4 tem o mesmo potencial de aquecimento global que 25 unidades de dióxido de carbono (Wittenberg, 2008).

Para melhorar a conversão alimentar dos animais que se encontram em condições de pastejo, antibióticos são fornecidos para aumentar o ganho de peso por meio de mudança na fermentação ruminal, ou seja, seleção de bactérias Gram-negativas em detrimento das Gram-positivas, proporcionando a fermentação do alimento por bactérias que promovem o acúmulo de ácido propiônico (Goulart, 2010). Entretanto, desde a proibição do uso de antibióticos na dieta dos ruminantes pela União Europeia em 2003, é crescente a procura por compostos que os substituam e que tenham o mesmo efeito na eficiência da fermentação ruminal (Tekippe et al., 2012). Ou seja, faz-se necessário a substituição de tal produto por outro com igual capacidade de modificação da fermentação ruminal, mas que também seja capaz de aumentar o ganho de peso ou a produção de leite, e ainda reduzir a produção de metano pelos ruminantes.

Os chamados “aditivos naturais” têm sido estudados há alguns anos com os objetivos de mudanças na fermentação ruminal e de redução na produção de metano (CH₄). Eles são metabólitos secundários extraídos de diferentes partes das plantas por meio da técnica de arraste a vapor, na maioria das vezes (Benchaar & Greathead, 2011). De acordo com Benchaar & Greathead (2011) a atividade antibacteriana dos metabólitos secundários tende a ser mais seletiva contra as bactérias Gram-positivas, pois as Gram-negativas possuem uma membrana externa que age como uma barreira, porém, ainda assim, os metabólitos atravessam a membrana celular por serem muito pequenos e, assim, acessam a membrana citoplasmática.

Efeitos dos metabólitos secundários de plantas sobre os parâmetros de fermentação ruminal têm sido avaliados *in vitro* e *in vivo* com o objetivo de reduzir a produção de metano (CH₄) sem alterações na eficiência de uso da dieta. A redução na produção de CH₄ foi estudada, *in vitro*, por Busquet et al. (2005) e Macheboeuf et al. (2008), os quais observaram redução da produção desse gás ao avaliarem diferentes metabólitos em diferentes doses. Além do CH₄, mudanças nas concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV) também são observadas. De acordo com Benchaar et al. (2007) redução na concentração de AGV em experimentos *in vitro* podem indicar que tais metabólitos podem ser prejudiciais aos ruminantes se os mesmos efeitos forem observados *in vivo*, uma vez que os AGVs representam a maior fonte de energia para esses animais.

Alterações nas concentrações de nitrogênio amoniacal também são relatadas por Benchaar et al. (2007) e Cardozo et al. (2005). De acordo com McIntosh et al. (2003) a redução na concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) é causada pela inibição das bactérias produtoras de amônia.

Dessa forma, objetivou-se avaliar *in vitro* o efeito de duas doses de cinco de metabólitos secundários de plantas e de extratos de duas espécies típicas do cerrado, em uma dieta com 80% *B. brizantha* cv. Marandu e 20% concentrado proteico, na produção do metano ruminal, ácidos graxos voláteis, nitrogênio amoniacal e degradabilidade do alimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Meio ambiente *versus* Produção de ruminantes

A atmosfera possui naturalmente alguns gases, como o vapor de água (H₂O), dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e ozônio (O₃), que captam o calor emitido pela superfície da Terra e a mantém aquecida (Ishler, 2008). Contudo, o aumento da concentração desses gases provoca o aquecimento da superfície terrestre e a destruição da camada de ozônio na estratosfera (Primavesi et al., 2004) com reflexos nas mudanças climáticas, tais como distribuição irregular das chuvas, elevação do nível do mar, aumento ou diminuição da temperatura da atmosfera, entre outros (Cerri & Cerri, 2007).

As estimativas das emissões do gás metano no setor de criação de ruminantes são baseadas nos gases provenientes da fermentação entérica e da produção de esterco (Wittenberg, 2008). O metano é um subproduto da fermentação ruminal e ao ser produzido viabiliza o funcionamento do rúmen, por servir como o principal utilizador de hidrogênio e permitir o correto funcionamento dos sistemas enzimáticos (Moss, 2010). No entanto, a produção desse gás representa perda de energia para produção animal e as ações para reduzir sua emissão são benéficas tanto para o setor produtivo quanto para o meio ambiente (Makkar & Vercoe, 2007), pois uma unidade de CH₄ tem o mesmo potencial de aquecimento global que 25 unidades de carbono (Soussana et al., 2009).

Johnson & Johnson (1995) relataram que a perda de metano varia de 2 a 12% da energia bruta ingerida, e que geralmente, à medida que a digestibilidade da dieta aumenta, aumenta também a perda de metano. Contudo, de acordo com Machado et al. (2011), a produção de metano entérico deve ser expressa considerando-se a produção de metano por unidade de produto animal formado (leite, carne, lã). Yan et al. (2010) em revisão de 20 estudos sobre metabolismo energético envolvendo 579 vacas leiteiras de

diferentes genética, período de lactação, número de animais em lactação e peso vivo, avaliaram a relação entre a produção de metano perdido na forma de energia com os fatores relacionados à produção animal e à eficiência energética em vacas leiteiras sob regimes alimentares normais. Os autores concluíram que a perda de energia na forma de metano como proporção de energia ingerida (energia bruta, energia digestível e energia metabolizável) ou produção de leite pode ser reduzida pelo aumento na produção de leite, eficiência energética de produção de leite ou pela redução da energia perdida para manutenção.

O Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação e instituições colaboradoras, publicaram em 2013 dados referentes a emissão de metano no setor da agropecuária no ano de 2010 e constataram que a principal fonte foi proveniente da fermentação entérica do gado de corte (75%) e do gado de leite (12%), enquanto que outros setores da agropecuária, como cultivo de arroz, queima dos resíduos agrícolas da cana-de-açúcar e manejo de dejetos dos animais contribuíram apenas com 13% das emissões (**Figura 1.1**).

De acordo com Simm (2010) a demanda global por produtos pecuários irá dobrar na primeira metade desse século, como consequência do aumento da população humana e, para atender a essa demanda, é necessário que investimentos sejam aplicados nos sistemas de criação de animais, com o objetivo de minimizar as emissões de gases de efeito estufa e torná-los adaptados às mudanças climáticas, contribuindo de maneira mais eficiente para a necessidade global por mais alimentos.

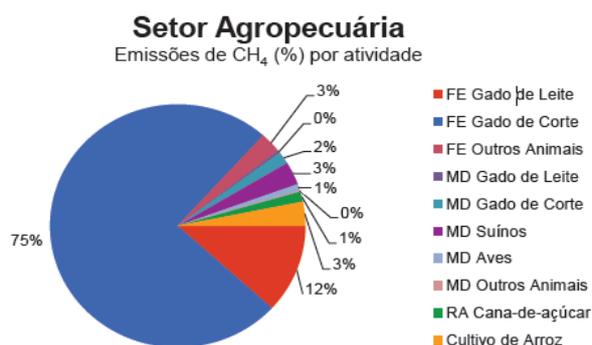


Figura 1.1 FE - fermentação entérica; MD - manejo de dejetos; e RA - resíduos agrícolas. Fonte: Ministério da Tecnologia, Ciência e Informação, 2013.

As alternativas para a redução da emissão de metano pela pecuária devem ser adotadas em conjunto, e estão relacionadas à melhoria da dieta, das pastagens e da genética animal e também à suplementação alimentar (Pedreira & Primavesi, 2011).

2.2. Produção animal a pasto

O clima tropical, predominante no território brasileiro, é caracterizado por temperatura elevada durante todo o ano e baixa amplitude térmica; precipitação elevada durante o verão e os invernos secos (Coimbra & Tibúrcio, 2002). Esses fatores tornam a região propícia ao desenvolvimento de vários gêneros de plantas forrageiras que são encontradas pelo país, como *Andropogon*, *Cynodon*, *Panicum*, *Pennisetum* e, principalmente, *Brachiaria* (Fonseca et al., 2010). Esta última é pouco exigente em fertilidade do solo, característica ideal para o desenvolvimento em solos tropicais brasileiros, que sofreram intensa intemperização e lixiviação de nutrientes (Resende et al., 2002).

A produção bovina em pastagens é uma forma competitiva e eficiente de produzir carne de boa qualidade a baixo custo (Da Silva, 2009). A competitividade depende do aumento da capacidade de suporte dos pastos (Euclides, 2001) e da eliminação dos períodos de perda de peso, ou seja, o crescimento deve ser constante todo o ano, para que o animal alcance as condições de abate, peso e, ou terminação mais cedo (Reis et al., 2009). Quanto à eficiência, esta relaciona-se com a intensificação do processo produtivo por meio do aumento da produção de forragem e da eficiência de colheita da forragem produzida, capazes de otimizar a produção animal (Da Silva, 2009).

No Brasil há, aproximadamente, 170 milhões de hectares de pastagens (Fonseca et al., 2010), que suportam cerca de 205 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2006), constituindo-se na base de sustentação da pecuária de corte brasileira e a fonte mais barata de alimento (Moraes et al., 2006). De acordo com Lenzi (2003), o pasto, exclusivamente, é responsável por quase 90% da carne bovina consumida no Brasil.

As pastagens têm potencial para produção bovina ainda maior quando o sistema é intensificado, ou seja, quando o melhor nível de integração entre performance e taxa de lotação da pastagem é obtido (Corsi, 1993). Alternativas, como a suplementação alimentar, a irrigação, uso de fertilizantes, dentre outros, são propostas de intensificação (Da Silva & Nascimento Jr., 2006).

Os cuidados com as pastagens são essenciais para que a produção de carne em pasto constitua-se em um sistema sustentável, premissa básica para atender às novas exigências do mercado. Entretanto, a utilização exclusiva desse recurso produtivo, de acordo com Euclides Filho (2001), é bioeconomicamente inviável em um empreendimento que busca manter-se e prosperar em um mercado em que a competitividade por preço e por qualidade do

produto impõe mudanças no setor, com introdução de tecnologias para melhorar os índices zootécnicos e o modo como as pastagens são manejadas.

De acordo com Reis et al. (1999), quando os níveis de nutrientes nos pastos atendem aos requerimentos de manutenção e de produção, a produção animal será em função do consumo de energia digestível, visto que é alta a correlação entre o consumo de forragem e o ganho de peso. Entretanto, a suplementação do animal criado a pasto tem como objetivos intensificar o uso das pastagens, por possibilitar o aumento na taxa de lotação; fornecer os nutrientes deficientes na pastagem; melhorar a eficiência alimentar (Lana, 2002); e conforme Reis et al. (2009), para aumentar o desempenho e reduzir a idade ao abate.

Para produzir animais em quantidade e qualidade, a suplementação da dieta é uma alternativa tecnológica que permite o ajuste nutricional entre a curva de oferta das pastagens e a demanda dos bovinos em pastejo, o que é fundamental para aumentar a precocidade dos sistemas de produção de carne (Zervoudakis et al., 2008).

De acordo com Tekeli et al. (2007), o sistema intensivo de criação de ruminantes, principalmente de vacas leiteiras, requer altos níveis de energia e de proteína provenientes do amido e de proteínas de alta qualidade, que são rapidamente fermentados no rúmen. Os antibióticos eram usados com o objetivo de retardar a degradação da proteína ruminal por meio da supressão das bactérias responsáveis por essa degradação (Tekeli et al., 2007) e também para melhorar a eficiência de uso do nutriente pela redução da quantidade total de metano produzido (Cardozo et al., 2004). Porém, desde a proibição do uso de antibióticos na dieta dos ruminantes pela União Europeia em 2003 é crescente a procura por compostos que os substituam e que tenham o mesmo efeito na eficiência da fermentação ruminal (Tekippe et al., 2012).

A intensificação da produção animal é uma forma de reduzir a abertura de novas áreas e de uso racional e sustentável dos recursos disponíveis que, conseqüentemente, proporcionarão redução nos custos de produção, pela utilização de estratégias de aumento de produção (Silveira et al., 2004; Da Silva & Nascimento Jr., 2006). Além disso, o manejo da microbiota ruminal, a melhora da digestibilidade do alimento para aumentar o ganho de peso ou a produção de leite, ou a redução da produção de metano pelos ruminantes, são objetivos pertinentes na criação dos ruminantes e, portanto, há a necessidade de uso dos chamados aditivos naturais que tenham potencial para promover as mudanças citadas (Broudiscou et al., 2000). Além disso, o consenso de que o aquecimento global é evidente e que os gases de efeito estufa liberados na atmosfera devem ser mitigados, contribuirão para que os

antibióticos fossem substituídos pelos metabólitos secundários de plantas (McGinn et al., 2004).

2.3. Metabólitos secundários de plantas

As plantas produzem diversos compostos orgânicos envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento, como a fotossíntese, a respiração e a síntese de proteínas e carboidratos, sendo tais compostos chamados de metabólitos primários (Taiz & Zeiger, 2006). Os metabólitos secundários não estão envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento, mas sim com a adaptação dos vegetais aos fatores externos e têm a função de protegê-los de fatores abióticos, como disponibilidade de água, exposição à luz e composição do solo, e de fatores bióticos, como exemplo, a interação da planta com micro-organismos patogênicos (Pavarini et al., 2012).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (**Figura 1.2**) (Vizzotto et al., 2010).

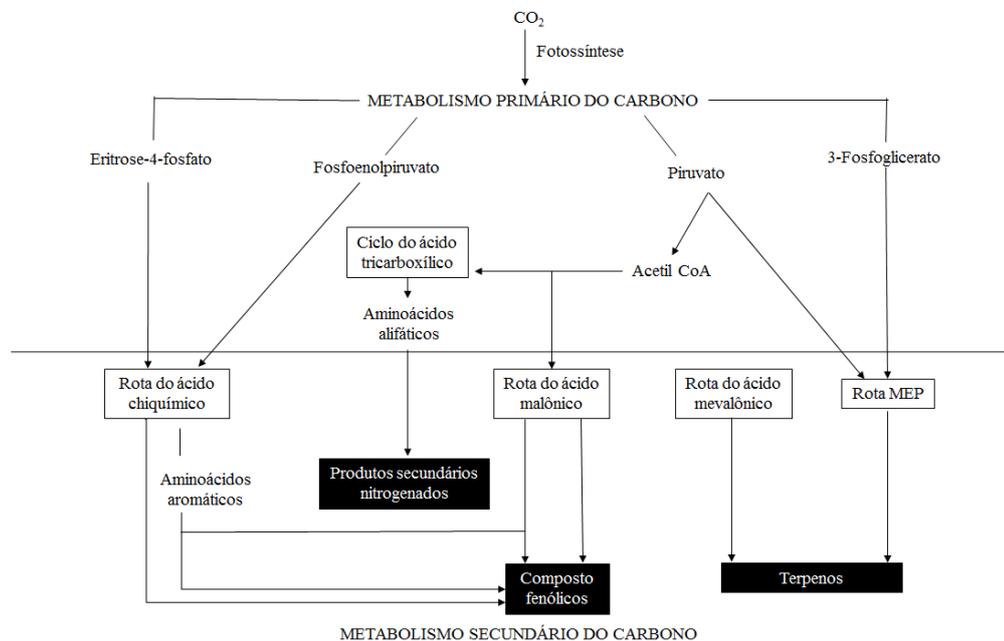


Figura 1.2. Visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário. Fonte: Adaptado de Taiz & Zeiger, 2006.

Os terpenos são biossintetizados a partir da rota do ácido mevalônico (rota principal) e da rota do metileritritol fosfato (MEP) (Taiz & Zeiger, 2006), e constituem o maior grupo de compostos secundários de plantas, com sua classificação dependente do

número de unidades isoprenóides (**Figura 1.3A**) que os compõem: duas unidades de isoprenóides formam monoterpênos, três formam sesquiterpênos, quatro formam diterpênos e acima de nove unidades são chamados de politerpênoídes (Ashour et al., 2010). Dois exemplos de monoterpênos são o timol e o carvacrol (**Figuras 1.3B e 1.3C**), ambos encontrados no orégano (*Origanum vulgare*) e em seu óleo essencial; o timol é o principal composto da planta *Thymus vulgaris*, conhecida como tomilho (Benchaar & Greathead, 2011).

Os compostos fenólicos são caracterizados por terem um anel aromático e um grupo hidroxila ligado a ele (**Figura 1.4A**), possuindo várias rotas biossintéticas, sendo as principais a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Bodas et al., 2012). A partir dessas duas rotas são formados os taninos (**Figura 1.4B**), os flavonoides, (Taiz & Zeiger, 2006) e os estilbenos, com seu maior representante sendo o resveratrol (**Figura 1.4C**) (Vaccari et al., 2009).

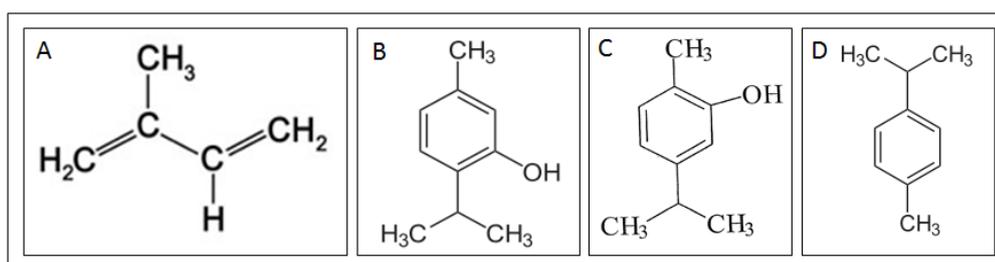


Figura 1.3. A - unidade isoprênica formadora de terpenos; B - estrutura química do timol; C - estrutura química do carvacrol; D - estrutura química do cimeno.

Uma etapa importante na rota de formação dos compostos fenólicos é a reação que ocorre entre o aminoácido fenilalanina e a enzima catalisadora fenilalanina amonialiase, que faz com que ocorra a perda da amônia do aminoácido para a formação do ácido cinâmico (Peterson et al., 2010). Em seguida ocorre a adição de grupos hidroxilas e reações de redução, produzindo o álcool p-cumárico (Dixon et al., 2001). Os compostos passam a ser chamados de fenilpropanóides por conterem um anel benzênico (**Figura 1.4D**) e uma cadeia lateral de três carbonos, sendo esta estrutura importante na formação de compostos mais complexos, como a lignina (Taiz & Zeiger, 2006). Um importante fenilpropanóide formado é o cinamaldeído (**Figura 1.4E**), encontrado na planta canela (*Cinnamomum cassia*) e em seu óleo essencial (Benchaar & Greathead, 2011).

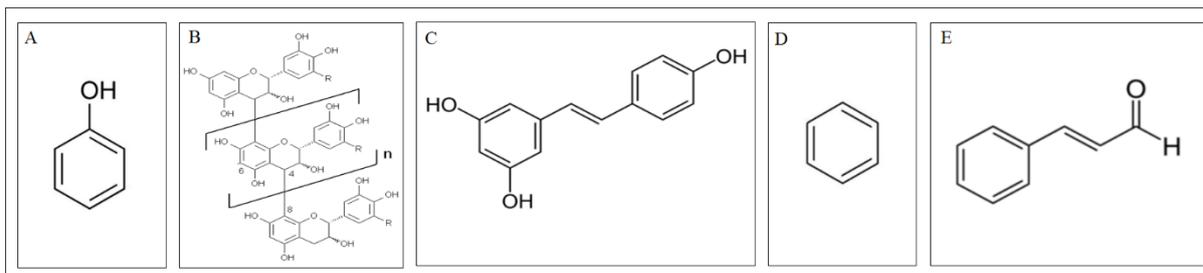


Figura 1.4. A – estrutura fenólica; B – estrutura química do tanino condensado; C - estrutura química do resveratrol; D - anel benzênico; E - estrutura química do cinamaldeído.

Além dos grupos de metabólitos secundários descritos anteriormente há também os compostos sulfurados derivados da cisteína, que se subdividem em sulfóxidos de S-alilcisteína e γ -glutamil-S-alilcisteína (Medeiros & Santos, 2010). As espécies do gênero *Allium* (cebola e alho) são caracterizadas por conterem alto teor desses compostos, o que dá a eles seu aroma e sabor característicos (Muniz, 2007).

2.3.1. Óleos essenciais

Óleos de plantas e seus extratos têm sido usados há milhares de anos na perfumaria, na aromatização de bebidas e na preservação de alimentos armazenados devido à sua atividade antimicrobiana (Hammer et al., 1999). Eles são extraídos das folhas, flores, cascas, rizomas e frutos das plantas por meio da técnica de arraste a vapor na maioria das vezes (Bizzo et al., 2009). O interesse na sua utilização na alimentação dos ruminantes cresceu nos últimos anos devido a União Europeia ter proibido o uso de antibióticos como aditivos nos alimentos desses animais (Sousa & Silva, 2008). No Brasil, somente alguns aditivos foram proibidos, mas é importante atentar para as barreiras comerciais impostas pelos países europeus ou da América do Norte, como o Canadá, aos produtos que contenham resíduos de algum aditivo ainda utilizado no Brasil (Sousa & Silva, 2008).

2.3.2. Propriedades antimicrobianas e modo de ação dos metabólitos secundários

De acordo com Benchaar & Greathead (2011) a atividade antibacteriana dos óleos essenciais tende a ser mais seletiva contra as bactérias Gram-positivas, pois as Gram-negativas possuem uma membrana externa que age como uma barreira aos óleos essenciais, contudo, ainda assim os metabólitos secundários atravessam a membrana por serem muito

pequenos e, assim, acessam a membrana citoplasmática através das proteínas porinas presentes na membrana externa (**Figura 1.6**).

Nas bactérias Gram-positivas (**Figura 1.5**), 90% da parede celular correspondem a peptidoglicano e algumas bactérias podem apresentar substâncias ácidas denominadas ácidos teicoicos, parcialmente responsáveis pela carga negativa da superfície celular e atuando na ligação de íons cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) (Madigan et al., 2010).

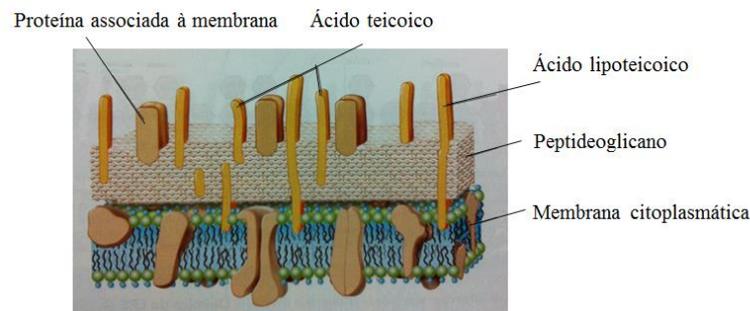


Figura 1.5. Diagrama resumido da parede celular bacteriana Gram-positiva. Fonte: Madigan et al. (2010).

Nas bactérias Gram-negativas (**Figura 1.6**) cerca de 10% da parede celular total consistem em peptidoglicano e o restante é composta pela membrana externa, que corresponde a uma segunda bicamada lipídica, composta não só por fosfolipídeos e proteínas, mas também por polissacarídeos; por esse motivo, a membrana externa também é denominada camada lipopolissacarídica (Madigan et al., 2010).

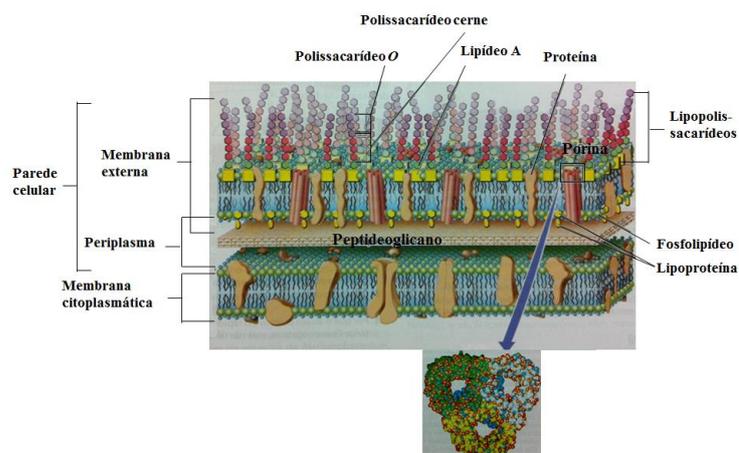


Figura 1.6. Diagrama resumido da parede celular bacteriana Gram-negativa. A proteína porina encontra-se destacada. Fonte: Madigan et al. (2010).

Monoterpenos fenólicos e compostos fenólicos

De acordo com Dorman & Deans (2000), a estrutura fenólica ligada ao grupo hidroxila e encontrada nos compostos timol e carvacrol, é de extrema importância para exercer atividade antimicrobiana. Os autores avaliaram óleos provenientes das plantas *O. vulgare* e *T. vulgaris* sobre diversos gêneros de bactérias, como exemplos, *Clostridium* sp.; *Escherichia* sp., *Lactobacillus* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., e observaram uma alta atividade do carvacrol e do timol contra elas, enquanto que monoterpenos como o cimeno que não possui o grupo hidroxila no anel benzênico (**Figura 1.3D**), não exerceu nenhuma atividade antibacteriana.

O acúmulo de compostos lipofílicos, como exemplos os compostos fenólicos, na parte hidrofóbica da bicamada fosfolipídica da parede das bactérias Gram-negativas, pode provocar um distúrbio nas interações entre as cadeias acil dos fosfolipídeos, que levará a uma modificação na fluidez da membrana e, eventualmente, ao inchaço da bicamada (Sikkema et al., 1995; Ultee et al., 2002). A interação que ocorre entre os compostos fenólicos com as cadeias acil dos fosfolipídeos provoca a insaturação dessas, o que modifica a atividade da proteína quinase, reconstituidora das vesículas fosfolipídica (Sikkema et al., 1995). Contudo, a desestabilização da membrana pelos compostos fenólicos não explica a alta atividade antimicrobiana desses quando comparada com o cimeno, pois este, mesmo não sendo um composto fenólico, também possui tal propriedade (Ultee et al., 2002).

Ultee et al. (2002) propuseram que o carvacrol atua como carreador trans-membrana de cátions monovalentes, trocando o próton hidroxila por outro íon, como o íon potássio. O carvacrol não dissociado difunde-se através da membrana citoplasmática para o citoplasma onde dissocia-se pela liberação do seu próton (H^+) no citoplasma. Ele retorna do citoplasma para o meio externo na forma não dissociada ao carregar um íon potássio (K^+), ou outro cátion do citoplasma consigo. Na membrana externa, um próton é recolhido (K^+), e o carvacrol na forma protonada difunde-se novamente pela membrana citoplasmática e dissocia-se liberando o próton no citoplasma (**Figura 1.7**).

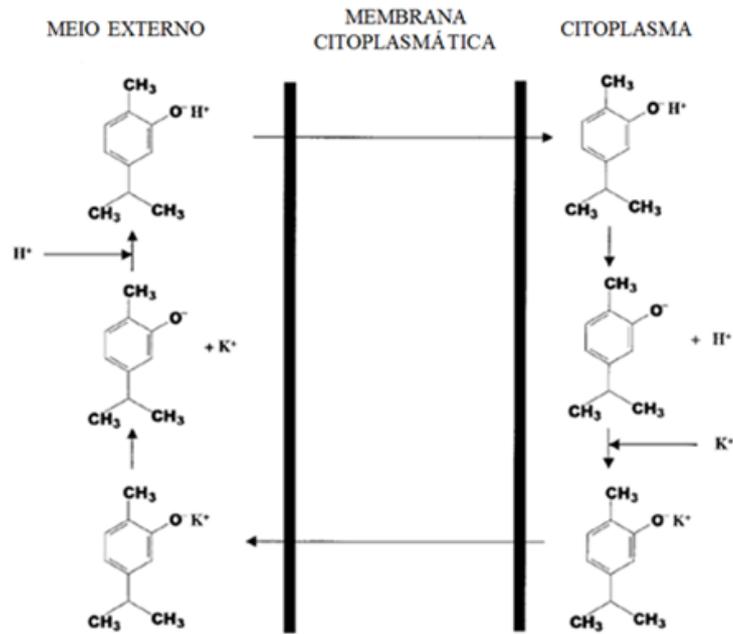


Figura 1.7 Visão esquemática da hipótese de atividade do carvacrol. Fonte: Ultee et al. (2002).

De acordo com Guarda et al., 2011 a presença da membrana externa que circunda a parede de lipopolissacarídeos nas bactérias Gram-negativas as tornam menos sensíveis aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas. Os autores citados observaram, em estudo com *Escherichia coli* (Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* e *Listeria innocua* (Gram-positivas), que foi necessária maior concentração de timol e carvacrol para inibir a atividade da *E. coli* devido à presença da parede de lipopolissacarídeos que ela apresenta e que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos; ainda assim, os compostos foram capazes de penetrar essa membrana externa, aumentando a permeabilidade da adenosina trifosfato (ATP) na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, alterando a permeabilidade passiva da célula.

Os estilbenos são uma classe de polifenóis sintetizados por inúmeras famílias de plantas, dentre elas a Moraceae (Shrikanta et al., 2013) e nos últimos anos tem recebido atenção devido às suas propriedades antioxidantes, antifúngicas e antibacterinas (Santin & Caliari, 2007). Brown et al. (2009) avaliaram o efeito do resveratrol na bactéria *Helicobacter pylori* (Gram-negativa) e atribuíram a sua atividade antibacteriana à capacidade que ele tem de interagir com os lipopolissacarídeos da membrana celular e reduzir sua estabilidade, e também de alterar a conformação da proteína bacteriana e afetar o transporte iônico.

Fenilpropanóide

O cinamaldeído é o principal composto ativo do óleo de canela e também tem demonstrado atividade antifúngica (Wei et al., 2011) e antimicrobiana, atuando de maneira diferente quando comparado aos compostos fenólicos (Helander et al., 1998; Gill & Holey, 2004; Busquet et al., 2005).

Gill & Holey (2004) observaram que o cinamaldeído apresentou atividade antibactericida para *Lactobacillus sakei* e *Listeria monocytogenes*, ambas bactérias Gram-positivas, sem agir como transportador de íons, como os compostos fenólicos agem. Os autores sugerem que o modo de inibição no metabolismo energético das bactérias pode ocorrer ou por interação com a membrana celular, ou por utilização de glicose. Os resultados observados no experimento foram consistentes com um mecanismo de ação no qual o cinamaldeído interage com a membrana da célula e provoca uma perturbação o suficiente para dispersar a força próton motriz, que causa vazamento de pequenos íons sem apresentar vazamento de componentes celulares de maiores dimensões, como o ATP. Os autores sugerem, também, após observarem depleção de ATP, que o cinamaldeído pode ter inibido a importação de glicose ou inibição da enzima envolvida na glicólise.

O diferente modo de ação entre um composto fenólico e um fenilpropanóide foi observado por Helander et al. (1998) ao testarem timol, carvacrol e cinamaldeído contra *E. coli*, e *Photobacterium leiognathi* (Gram-negativas). Os dois primeiros compostos liberaram lipopolissacarídeos e reduziram o ATP intracelular e aumentaram o ATP extracelular, reflexo da desintegração da membrana citoplasmática, sendo o mesmo não observado para o cinamaldeído. Este, assim como o carvacrol e o timol, apresentou alta atividade inibitória no crescimento das bactérias, no entanto, os autores sugerem que possivelmente esse composto agiu na célula penetrando-a através da proteína porina, que permite que compostos pequenos penetrem na célula. As proteínas porinas estão localizadas na membrana externa das bactérias Gram-negativas e atuam como canais, permitindo a entrada e saída de substâncias hidrofílicas de baixa massa molecular (Madigan et al., 2010).

Compostos organossulfurados

Bulbos intactos de alho (*Allium sativum*) cru contém compostos organossulfurados inodoros como o γ -glutamil-S-alil-L-cisteína e o sulfóxido S-alil-L-cisteína que, quando são amassados, são convertidos em compostos tiosulfatos, como a alicina, por reações enzimáticas (Agamase, 2006). Ao passar pelo processo de destilação a

vapor, a alicina é degradada e forma vários compostos organossulfurados, como dialil sulfeto, dialil dissulfeto, dialil trissulfeto entre outros (**Figura 1.8**) (Wang et al., 2011).

A atividade antibacteriana do óleo essencial de alho foi reportada por O'Gara et al. (2000) ao testarem não só o óleo mas também seus constituintes separadamente (alicina, dialil dissulfeto - DADS; dialil trissulfeto – DADT; e dialil tetrasulfeto - DADTT) contra a *H. pylori*. Os resultados mostraram que DADTT inibiu mais a atividade da bactéria, seguido do DADT e alicina. Embora o DADS tenha sido o maior constituinte do óleo essencial de alho, este apresentou menor atividade antimicrobiana do que aqueles. Para os autores os altos níveis de atividade contra a *H. pylori* encontrado para alicina, DADS e DADTT em relação ao óleo essencial, pode estar relacionado ao número de átomos de enxofre presentes por molécula. O óleo essencial de alho pode ter apresentado maior ação contra a *H. pylori* se comparado com o DADS devido aos efeitos sinérgicos entre os constituintes do óleo ou devido à presença de compostos não avaliados, como polissulfetos e sulfeto de metila.

A hipótese de que o número de átomos de enxofre presente nas moléculas dos compostos organossulfurados pode ser responsável por maior inibição do crescimento de bactérias também foi levantada por Tsao & Yin (2001). Estes autores testaram óleo essencial de alho, dialil monossulfeto (DAS), DADS, DADTS e DADTT contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* e observaram que a concentração inibitória mínima seguiu a ordem DAS > DADS > DADTS > DADTT = óleo essencial de alho.

Longas cadeias de polissulfetos têm propriedades semelhantes a solventes orgânicos, como o nonano e o decano, os análogos de carbonos saturados do dialiltrissulfeto e dialitetrasulfeto, respectivamente (Münchberg et al., 2007). Embora a comparação seja especulativa, a toxicidade desses compostos, especialmente quando em alta concentração, pode resultar em interações hidrofóbicas, como o rompimento da membrana celular ou ligações com proteínas hidrofóbicas com subsequente desdobramento da estrutura da proteína (Münchberg et al., 2007).

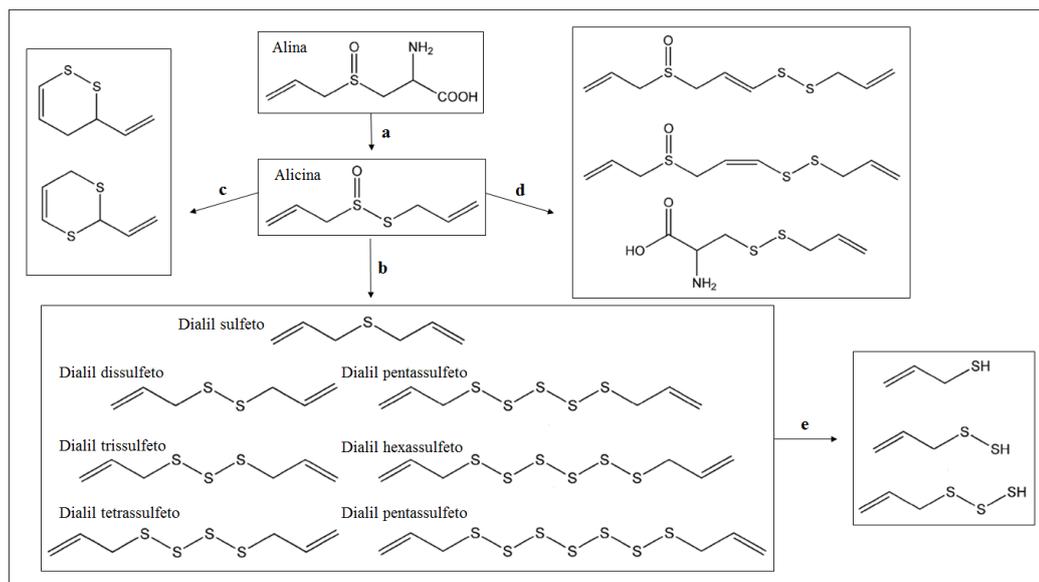


Figura 1.8. Compostos de enxofre biologicamente importantes encontrados no alho. Alina (1) é enzimaticamente convertida a alicina (2) (reação a). A decomposição ou degradação da alicina resulta em vários produtos secundários (reações b, c, d, e). Fonte: Münchberg et al., 2007.

Fujisawa et al. (2009) observaram o efeito da alicina sobre a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e a Gram-negativa *E. coli*, e observaram perda da atividade antimicrobiana da alicina, após tratada com compostos SH (grupo tiol). Os autores sugerem que o alvo molecular da alicina, mais precisamente seu fragmento alil tiol ($S-CH_2-CH=CH_2$), seja os componentes contendo SH em bactérias, fazendo com que o ataque à bactéria *S. aureus* seja mais efetivo, devido à falta de proteínas na parede celular, se comparado ao ataque à bactéria *E. coli* que possui, aproximadamente, 9% da parede celular formada por proteínas, que previnem a entrada na célula do fragmento $S-CH_2-CH=CH_2$ e, conseqüentemente, torna-a menos sensível à alicina.

Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos de alto peso molecular e são agrupados de acordo com suas características estruturais e propriedades químicas, dividindo-se em duas classes bem definidas: taninos hidrolisáveis, que compreendem os polímeros de ácido elágico ou gálico, e os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, que compreendem os polímeros de catequinas (Lemos, 2012).

Os múltiplos grupos fenólicos ligados à hidroxilas encontrados nos taninos permitem a eles a formação de complexos com proteínas e com polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina) (Schofield et al., 2001). Nos ruminantes, o pH do meio ruminal favorece a formação do complexo tanino-proteína, o que leva à redução da degradação da

proteína e, como consequência, menor produção de nitrogênio amoniacal e maior fluxo de nitrogênio não amoniacal para o duodeno (Frutos et al., 2004). Entretanto, de acordo com Taiz & Zeiger (2006), a formação de desse complexo pode provocar impacto negativo na dieta dos herbívoros uma vez que ele é difícil de digerir. No aparelho digestivo desses animais, as enzimas presentes na folhagem dos vegetais oxidam os fenóis às suas formas quinônicas correspondentes, sendo estas altamente reativas e ligando-se aos grupos nucleofílicos ($-NH_2$ e $-SH_2$) das proteínas (Taiz & Zeiger, 2006).

Segundo Frutos et al. (2004) os mecanismos pelos quais os taninos reduzem a degradação ruminal de diferentes componentes dietéticos não estão claros, contudo, os mais aceitos envolvem privação de substrato, inibição enzimática e ação direta nos micro-organismos ruminais. Além da formação do complexo tanino-proteína por meio de ligações de hidrogênio, os taninos condensados também podem formar complexos com as enzimas microbianas, interferindo na adesão dos micro-organismos ao alimento e, conseqüentemente, inibindo a digestão da fibra pelas bactérias celulolíticas (McAllister et al., 1994).

Já a ação direta dos taninos nos micro-organismos foi analisada por O'Donovan & Brooker (2001) que observaram que na presença de tanino, as bactérias *Streptococcus bovis* e *S. gallolyticus* tiveram a fase lag estendida antes do crescimento exponencial e apresentaram redução na taxa de crescimento. A espécie *S. gallolyticus* adaptou-se ao meio com tanino o que permitiu a ela continuar a crescer, embora em taxa reduzida. De acordo com os autores, um maior período da fase lag causado pela presença do tanino sugere que o crescimento pode ser parcialmente dependente de transformações metabólicas do tanino ou do desenvolvimento de uma barreira protetora, fato comprovado pela observação da formação de uma matriz extracelular pela *S. gallolyticus*.

2.4. Principais produtos da fermentação ruminal

A fermentação em ruminantes é o resultado da atividade física e microbiológica, que converte os componentes da dieta em ácidos graxos voláteis (AGV), proteína microbiana, amônia (NH_3), vitaminas do complexo B e vitamina K, metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), entre outros (Valadares Filho & Pina, 2011).

O nitrogênio dietético na forma de proteína verdadeira e o nitrogênio não proteico sofrem a ação dos micro-organismos ruminais, sendo que parte da proteína verdadeira é hidrolisada a aminoácidos pelas proteases e peptidases microbianas, e posteriormente deaminadas a NH_3 e ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (Lana,

2005). Os peptídeos, aminoácidos e NH_3 (proveniente da desaminação ou do nitrogênio não proteico) podem ser incorporados à proteína microbiana (Lana, 2005).

Como a maior parte dos lipídeos presentes nos alimentos ofertados aos ruminantes contém ácidos graxos insaturados, quando o lipídeo chega ao rúmen ele passa pelo processo de biohidrogenação realizado, principalmente, por bactérias e protozoários (Harfoot, 1981). Durante esse processo, os triglicerídeos são transformados em glicerol e ácidos graxos, e os galactolipídeos (presente nas forragens verdes) são transformados em galactose e ácidos graxos; o glicerol é fermentado a propionato e a galactose em AGV (Lana, 2005).

A maior parte da energia normalmente consumida pelos ruminantes é derivada de polissacarídeos presentes na parede celular dos vegetais, que podem ser divididos em: carboidratos fibrosos (celulose, hemicelulose) e carboidratos não fibrosos (amido, açúcares) (Kozloski, 2009). O piruvato é o composto intermediário da fermentação dos açúcares pelo qual passam todos os carboidratos antes de serem transformados em ácidos graxos voláteis (AGV), CO_2 e CH_4 e a proporção de cada um depende do tipo de carboidrato fermentado e das espécies bacterianas que estiverem no ambiente ruminal (Nussio et al., 2011).

2.4.1. Ácidos graxos voláteis (AGV)

Os carboidratos ao passarem pela fermentação ruminal produzem AGV, que em ordem decrescente de abundância são acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico, isovalérico e traços de vários outros ácidos (Ishler et al., 1996). Quando a pectina, a hemicelulose, a celulose, o amido, as frutanas e a sacarose sofrem a ação dos microorganismos, eles são transformados em piruvato através da via glicolítica, e depois convertido em AGV (Valadares Filho & Pina, 2011). O ácido acético pode constituir de 50 – 60% do total dos AGV produzidos; o ácido propiônico pode formar de 18 – 20% dos AGV totais; e o ácido butírico de 12 – 18% do total de AGV (Ishler et al., 1996).

A quantidade de matéria orgânica digerida no rúmen, bem como a participação da fibra nesse processo é a principal causa para a variação da concentração e da proporção de AGVs produzidos (Pedreira et al., 2004). Em geral, quando se diminui a proporção forragem:concentrado diminui-se também a proporção acetato:propionato (Nussio et al., 2011), uma vez que uma alta degradação da fibra resulta em aumento do acetato (Beenchar et al., 1998).

Mudanças nas concentrações dos AGVs podem ocorrer com a adição de óleos essenciais à dieta dos ruminantes, com a possível redução na concentração de acetato e aumento na de propionato, devido à atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, cujos produtos da fermentação é predominantemente o ácido acético (Johnson & Johnson, 1995).

2.4.2. Proteína microbiana

Os micro-organismos ruminais que retiram sua energia da fermentação dos carboidratos estruturais (celulose e hemicelulose) utilizam NH_3 como fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana, e os micro-organismos que retiram a energia dos carboidratos não estruturais (amido, pectina e açúcares) utilizam tanto NH_3 quanto aminoácidos para sintetizarem a proteína microbiana (Russell et al., 1992).

No processo de degradação da proteína degradada no rúmen (PDR) há a formação de peptídeos, aminoácidos (AA) e NH_3 , que são utilizados para síntese de proteína microbiana (Pmic) e multiplicação celular; o que não é incorporado nas células microbianas pode passar para o duodeno e ser absorvido pelo ruminante (Santos & Pedroso, 2011). As exigências proteicas de ruminantes são atendidas mediante absorção intestinal de AA e as principais fontes são a Pmic, que supre acima de 50% dos AA absorvidos, e a proteína não degradada no rúmen (PNDR), digestível no intestino delgado (Cardoso et al., 2000).

O nitrogênio da dieta pode escapar da fermentação no rúmen quando a taxa de digestão e a passagem do alimento for alterada, ou seja, quanto maior o consumo maior a passagem e, portanto, maior o escape (Van Soest, 1994). A concentração de proteína na dieta influencia o escape, uma vez que a passagem de qualquer ingrediente do rúmen depende da sua concentração nele, o que significa que a concentração de PNDR irá depender do conteúdo dietético e do nível de ingestão desta (Van Soest, 1994).

A hidrólise de proteínas por enzimas microbianas ruminais (proteases, peptidases, deaminases) libera oligopeptídeos, que são degradados a pequenos peptídeos e AA livres, e posteriormente transportados para o interior das células bacterianas (Santos & Pedroso, 2011). Porém, quando há uma quebra excessiva de peptídeos, ultrapassando a capacidade de assimilação ocorre uma produção excessiva de NH_3 e uma pequena retenção de nitrogênio. A redução da quebra dos peptídeos reduziria o fluxo de nitrogênio proteico para NH_3 no rúmen ajudando a aumentar a eficiência da retenção do nitrogênio pelo animal (WALLACE et al., 1997, citados por Barbosa et al., 2001).

O fornecimento de extratos naturais de plantas, como taninos e óleos essenciais, pode inibir a quebra de peptídeos (Morais et al., 2011) e causar acúmulo de peptídeos no fluido ruminal (Barbosa et al., 2001).

2.4.3. Metano (CH₄)

Além do AGV, da proteína microbiana e da amônia produzida durante a fermentação, outros produtos também são formados, como o CO₂, CH₄, N₂, H₂S, H₂ e O₂ (Valadares Filho & Pina, 2011).

O CO₂ é originado das reações de descarboxilação e das reações de neutralização do H⁺ pelo HCO₃⁻ proveniente da saliva ou secretado pelo epitélio ruminal, durante a absorção de AGV, e o CH₄ é oriundo do CO₂ e do formato formado pela atividade das bactérias metanogênicas (**Figura 1.9**) (Valadares Filho & Pina, 2011).

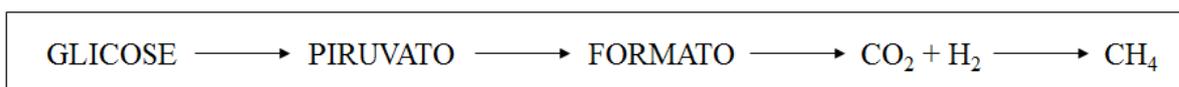


Figura 1.9. Formação de metano pelo formato. Fonte: Adaptado de Valadares Filho & Pina (2011).

O hidrogênio (H₂) utilizado para formar metano, de acordo com Russell (2002), é proveniente das bactérias não metanogênicas que possuem ligações hidrogenases em sua membrana capazes de produzir H₂ a partir de carreadores de elétrons reduzidos, como NADH, porém essas ligações são sensíveis e podem ser inibidas quando a pressão de H₂ se acumula. Como a baixa pressão de H₂ é necessária para que a fermentação ruminal continue adequada, esse H₂ precisa ser eliminado, e esse papel cabe às bactérias metanogênicas *Archaea* que usam o H₂ para reduzir o CO₂, produzindo CH₄ como produto final, sendo este, eructado pelo ruminante (Bodas et al., 2012).

De acordo com Johnson & Johnson (1995) há dois mecanismos que causam variação na produção de CH₄. O primeiro é a quantidade de carboidrato da dieta que é fermentado no retículo-rúmen. Esse mecanismo afeta o balanço entre as taxas de carboidrato fermentado e a passagem. O segundo mecanismo regula a disponibilidade de H₂ e, subsequentemente, a produção de CH₄ pela relação de AGVs produzidos. Segundo os autores, a fração de ácido propiônico que é produzido relativo ao ácido acético tem um impacto grande na produção de metano, com a perda de energia podendo chegar a 33% caso todo o carboidrato seja fermentado a ácido acético e nenhum ácido propiônico seja

produzido. Quanto maior a produção de propionato, menor a produção de CH_4 , uma vez que a produção deste ocorre por uma via diferente daquele, na qual não há produção de H_2 , que é um precursor do CH_4 (**Figura 1.10**) (Nussio et al., 2011).

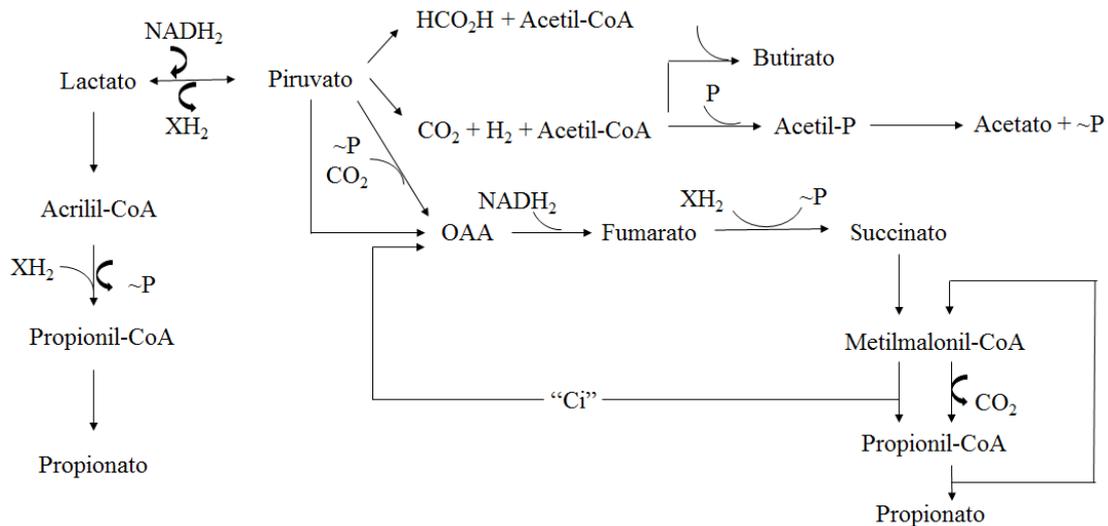


Figura 1.10. Vias de produção de ácidos graxos voláteis (AGV) a partir do piruvato. Fonte: Nussio et al. (2011).

Outros fatores como nível de ingestão de alimento e tipo de alimento também podem afetar a produção de CH_4 (Johnson e Johnson, 1995).

Ingestão de alimento e tipo de alimento

De acordo com Hegarty et al. (2007), as rações de maior digestibilidade apresentam associação positiva entre a ingestão de energia e a produção de CH_4 , provavelmente, devido à maior ingestão de alimento, que proporciona maior oferta de substrato para fermentação ruminal e assim maior oferta de H_2 para a metanogênese.

Pedreira et al. (2009) em experimento com vacas Holandesas e vacas mestiças em fase de lactação, observaram que as Holandesas emitiram mais CH_4 que as mestiças, devido ao tamanho corporal e, mais especificamente, ao potencial de ingestão de matéria orgânica (MO) por animais dessa raça que têm requerimento nutricional maior que as vacas mestiças. Entretanto, os autores observaram que a maior ingestão de MO digestível resultou em maior eficiência produtiva e, conseqüentemente, menor emissão de CH_4 por unidade de produto ou por ciclo produtivo. As vacas Holandesas tiveram produção média de leite de 23,5 L/dia e emissão de CH_4 de 393,2 g/dia, resultando em 16,7 litros de metano por litro de leite;

as vacas mestiças tiveram produção média de 11,5 L/dia de leite e 314 g/dia de CH₄, resultando em 27,3 litros de metano por dia.

Outro fator a ser considerado para reduzir a produção de CH₄ é a adição de concentrado à dieta dos ruminantes. Animais que consomem mais concentrado emitem menos CH₄ do que os que consomem forragem (Nussio et al., 2011). Mc Geough et al. (2010) observaram redução de 13,95% na produção de CH₄ ao fornecerem ração com silagem de trigo e concentrado à base de grãos de trigo na proporção de 53:47 em relação a ração de proporção 89:11. Também observaram aumento na produção de propionato e redução na produção de acetato, na relação acetato:propionato e no NH₃ ruminal. De acordo com os autores, essas respostas ocorreram devido ao aumento na quantidade de amido, proveniente do concentrado, que resultou em uma mudança na fermentação ruminal. O processo de produção de propionato requer H₂, enquanto que no processo de produção de ácido acético ocorre a produção de H₂, precursor na produção de CH₄ (Moss et al., 2000). Já a redução do NH₃ em decorrência do aumento de amido, para Mc Geough et al. (2010), pode ser um reflexo do aumento da síntese de proteína microbiana, facilitada pelo aumento na ingestão de amido.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAGASE, H. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease: clarifying the real bioactive constituents of garlic. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 716-725, 2006.

ASHOUR, M.; WINK, M.; GERSHENZON, J. Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. In: WINK, M. (Ed.). **Biochemistry of plant secondary metabolism**. 2 ed. United Kingdom: Ed. Wiley-Blackwell, 2010. 445p.

BARBOSA, N.G.S.; LANA, R.P.; MÂNCIO, A.B. Fermentação da proteína de seis alimentos por microrganismos ruminais, incubados puros ou com monensina ou Rumensin®. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1316-1324, 2001.

BECKER, P.M.; van WIKSELAAR, P.G. Effects of plant antioxidants and natural vicinal diketones on methane production, studied in vitro with rumen fluid and a polylactate as maintenance substrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 170, p. 201-208, 2011.

BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science Technology**, v. 166-167, p. 338-355, 2011.

BENCHAAR, C.; RIVEST, J.; POMAR, C. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanistic models and regression equations. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 617-627, 1998.

BIZZO, H.; HOVELL, A.M.; REZENDE, C.M.; **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. Química Nova, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 78–93, 2012.

BROUDISCOU, L.P.; PAPONA, Y.; BROUDISCOU, A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, p. 263-277, 2000.

BROWN, J. C.; HUANG, G.; HALEY-ZITLIN, V. et al. Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n.3, p. 848-852, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223– 253, 2004.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4393-4404, 2005.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

CARDOSO, R.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C. et al. Síntese microbiana, pH e concentração de amônia ruminal e balanço de compostos nitrogenados, em novilhos F1 Limousin x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 6, p. 1844-1852, 2000.

CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 11, p. 3230-3236, 2004.

CERRI, C.C.; CERRI, C.E. **Agricultura e aquecimento global**. Disponível em: <http://www.aquecimento.cnpem.br/bibliografia/agr_e_aquec_Cerri_2007.pdf>. Acesso: 25 jan. 2014.

CHAVES, A.V.; HE, M.L.; YANG, W.Z. et al. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 87, p. 413-419, 2007.

COIMBRA, P.J.; TIBÚRCIO, J.A.M. **Geografia: uma análise do espaço geográfico**. 2ª ed. São Paulo: HARBRA Ltda. 463 p. 2002.

CORSI, M. Parâmetros para intensificar o uso das pastagens. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Eds.). **Bovinocultura de corte: fundamentos para exploração racional**. 2ª ed. Piracicaba: FEALQ, p. 209-229, 1993.

DA SILVA, S.C. Conceitos básicos sobre sistemas de produção animal e pasto. In: SILVA, S.C.; PEDREIRA, C.G.S.; MOURA, J.C. (Eds.). **Intensificação de sistemas de produção animal em pasto**. Piracicaba: FEALQ, p. 7-35, 2009.

DA SILVA, S.C.; NASCIMENTO JR., D. Sistema intensivo de produção de pastagens. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 2, São Paulo, 2006. **Anais...** São Paulo, SP: CLANA (Colégio Latino Americano de Nutrição Animal), 2006. Disponível em: <<http://people.ufpr.br/~freitasjaf/artigos/sistemaintensivoproducaopastagens.pdf>>. Acesso em 12 abr. 2011.

DIXON, R.A.; CHEN, F.; GUO, D. et al. The biosynthesis of monolignols: a “metabolic grid”, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? **Phytochemistry**, v. 57, p. 1069–1084, 2001.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of

DUDAREVA, N; PICHERSKY, E; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, vol. 135, p. 1893–1902, 2004.

EUCLIDES FILHO, K. Interação genótipo-ambiente-mercado na produção de carne bovina nos trópicos. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 2, 2001, Viçosa. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2001, p. 93-115.

EUCLIDES, V.P.B. Produção intensiva de carne bovina em pasto. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 2, 2001, Viçosa. **Anais...** Viçosa, MG: UFV, 2001. p. 55-82.

FONSECA, D.M.; SANTOS, M.E.R.; MARTUSCELLO, J.A. Importância das forrageiras no sistema de produção. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Eds.). **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, p. 13-29, 2010.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F.J. Review: Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 191-202, 2004.

FUJISAWA, H.; WATANABE, K.; SUMA, K. et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 9, p. 1948-1955, 2009.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. **Química Nova**, vol. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GUARDA, A.; RUBILAR, J.F.; MILTZ, J. et al. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 144–150, 2011.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, p. 985–990, 1999.

HARFOOT, C.G. Lipid metabolism in the rumen. In: CHRISTIE, W.W. (Ed.). **Lipid metabolism in ruminant animals**. United State of America: Pergamon Press, 1981. p. 451.

HART, K.J.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; DUVAL, S.M. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, p. 8–35, 2008.

HEGARTY, R.S.; GOOPY, J.P.; HERD, R.M. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1479-1486, 2007.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and**

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rebanho bovino cai para 205,9 milhões de cabeças em 2006.** 2006a. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1053>. Acesso em: 19 abr. 2011

ISHLER, V. **Carbon, methane emissions and the dairy cow.** 2008. Disponível em: <<http://extension.psu.edu/animals/dairy/nutrition/nutrition-and-feeding/diet-formulation-and-evaluation/carbon-methane-emissions-and-the-dairy-cow-1>>. Acesso em: 12 de fev. 2014.

ISHLER, V.; HEINRICHS, J.; VARGA, G. **From feed to milk: understanding rumen function.** Willard Building: Penn State Cooperative Extension, 1996. 52p. (Extension Circular, 422).

JONHSON, K.A.; JONHSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 2483-2492, 1995.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes.** 2 ed. Santa Maria: Ed. da UFSM, 2009. 216p.

LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal (mitos e realidades).** 2ª ed. Viçosa: UFV, 2005. 344p.

LANA, R.P.; GOMES JR, P. Sistema de suplementação alimentar para bovinos de corte em pastejo. Validação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 451-459, 2002.

LENZI, A. **Desempenho animal e produção de forragem em dois sistemas de uso da pastagem: pastejo contínuo e pastoreio racional Voisin.** 2003. 133 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2003.

MACHADO, F.S.; PEREIRA, L.G.R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R. et al. **Emissões de metano**

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock.** 12 ed. São Paulo: Prentice Hall Brasil, 2010.

MAKAR, H.P.S.; VERCOE, P.E. **Measuring methane production from ruminants.** Springer, Dordrecht, The Netherlands.

MCALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3004-3018, 1994.

MCGEOUGH, E.J.; O' KIELY, P.; HART, K.J. et al. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. **Journal of Animal Science**, v. 88, p. 2703-2716, 2010.

MCGINN, S. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; COATES, T. et al. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3346–3356, 2004.

MCTI – MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. 2013. Disponível em: <<http://gvces.com.br/arquivos/177/EstimativasClima.pdf>>. Acesso em: 02 fev. de 2014.

MEDEIROS, A. J. D.; SANTOS, E. C. G. **Avaliação do efeito sinérgico antibacteriano de plantas constituídas por compostos sulfurados**. Sistema de Gerenciamento de Conferências (OCS). 2010. Disponível em: <<http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNAPI2010/paper/view/1380>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

MOLERO, R.; IBARS, M.; CALSAMIGLIA, S. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v.114 p. 91–104, 2004.

MORAES, E.H.B.K.; PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T. et al. Associação de diferentes fontes energéticas e protéicas em suplementos múltiplos na recria de novilhos mestiços sob pastejo no período da seca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p. 914-920, 2006.

MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, p.565-599, 2011.

MOSS, A.R.; JOUANY, J.P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales De Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000.

MÜNCHBERG, U.; ANWAR, A.; MECKLENBURG, S. Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 1505–1518, 2007.

MUNIZ, L.B. **Caracterização química, física e de compostos funcionais em cebolas frescas e minimamente processadas**. 2007. 160 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) – Faculdade de Nutrição, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M.L.M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, p.183-228, 2011.

O' GARA, E. A.; HIL, D. J.; MASLIN, J. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2269-2273, 2000.

O'DONOVAN, L.; BROOKER, J.D. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. **Microbiology**, v. 147, p. 1025-1033, 2001.

PAVARINI, D.P.; PAVARINI, S.P.; NIEHUES, M. et al. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science Technology**, v. 176, p. 5-16, 2012.

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. Aspectos ambientais na bovinocultura. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, p.521-564, 2011.

PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O.; LIMA, M.A. et al. Ruminant methane emission by dairy cattle in southeast Brazil. **Scientia Agricola Journal**, v. 66, n. 6, p. 742-750, 2009.

PEREIRA, M.S.; BERCHIELLI, T.T.; OLIVEIRA, S.G. et al. Produção de metano e concentração de ácidos graxos voláteis ruminal em bovinos alimentados com diferentes relações de volumoso:concentrado. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41, 2006, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, MS: SBZ, 2004. CD-ROOM.

PETERSON, M.; HANS, J.; MATERN, U. Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. In: WINK, M. (Ed). **Biochemistry of plant secondary metabolism**. 2 ed. United Kingdom: Ed. Wiley-Blackwell, 2010. 445p.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.S.; PEDREIRA, M.S. et al. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004.

REIS, R.A.; RODRIGUES, L.R.A.; PEREIRA, J.R.A. A suplementação como estratégia de manejo da pastagem. In: PEIXOTO, M.A; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. **Produção de bovinos a pasto**. Piracicaba: FEALQ, p. 123-150, 1999.

REIS, R.A.; RUGGIERI, A.C.; CASAGRANDE, D.R.; PÁSCOA, A.G. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 147-159, 2009 (supl. especial).

REIS, R.A.; RUGGIERI, A.C.; CASAGRANDE, D.R.; PÁSCOA, A.G. Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 147-159, 2009 (supl. especial).

RESENDE, M.; CCURI, N.; REZENDE, S.B.; CORRÊA, G.F. **Pedologia: base para distinção de ambientes**. 4ª ed. Viçosa: NEPUT, 2002.

RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. New York: Ithaca, 2002. p. 121.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SANTIN, N.C; CALIARI, V. Resveratrol em uvas e vinhos e suas principais propriedades biológicas. **Infarma**, v.19, n. 5/8, p. 131-133, 2007.

SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. Metabolismo de proteínas. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, p.265-298, 2011.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SHRIKANTA, A.; KUMAR, A.; GOVINDASWAMY, V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. **Journal of Food Science and Technology**, 2013.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.

SILVEIRA, J.C.; McMANUS, C.; MASCIOLI, A.S. et al. Fatores ambientais e parâmetros genéticos para características produtivas e reprodutivas em um rebanho Nelore no Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p.1432-1444, 2004.

SIMM, G. Guest editorial: Livestock and global climate change. **Animal Journal**, v. 3, p. 321-322, 2010.

SOUSSANA, J.F.; TALLEC, T.; BLANFORT, V. Mitigating the greenhouse gas balance of ruminant production systems through carbon sequestration in grasslands. **Animal Journal**, v. 4, p. 334-350, 2009.

SOUZA, R.V.; SILVA, V.A. **Implicações do uso de aditivos na alimentação animal: resíduos e barreiras às exportações**. Repositório Alice. 2008. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/894679/1/AACImplicacoesdouso.pdf>>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TEKELI, A.; ÇELIK, L.; KUTLU, H.R. Plant extracts: a new rumen moderator in ruminant diets. **Journal of Tekirdag Agricultural Faculty**, v. 4, n. 1, p. 71-79, 2007.

TEKIPPE, J.A.; HRISTOV, A.N.; HEYLER, K.S. et al. Effect of plants and essential oils on ruminal in vitro batch culture methane production and fermentation. **Canadian Journal Animal Science**, v. 92, n. 3, p. 395-408, 2012.

TSAO, S.M.; YIN, M.C. *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 665-670, 2001.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p. 1561–1568, 2002.

VACCARI, N. F. S.; SOCCOL, M. C. H.; IDE, M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages, v.8, n.1, p. 71-83, 2009.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 616.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2nd Edition. Ithaca, New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010, 16p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316)

WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 621–629, 2004.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B. et al. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- β -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1680–1685, 2011.

WEI, Q. Y.; XIONG, J. J.; JIANG, H. et al. The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p. 164-170, 2011.

WITTENBERG, K.M. **Enteric methane emissions and mitigation opportunities for Canadian CATTLE production systems**. Disponível em: <<http://www.vido.org/beefinonet/otherareas/pdf/CcbMethaneemissionsWittenburg.pdf>>. Acesso em: 20 de jan. 2014.

YAN, T.; MAYNE, C.S.; GORDON, F.G. et al. Mitigation of enteric methane emissions through improving efficiency of energy utilization and productivity in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 6, 2010.

ZERVOUDAKIS, J. T.; PAULINO, M. F.; DETMANN, E. et al. Suplementos múltiplos de autocontrole de consumo para recria de novilhos no período das águas: consumo de nutrientes e parâmetros ingestivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 754-761, 2008.

CAPÍTULO 2

RESUMO

EFEITO DE CINCO METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS COMBINADOS OU NÃO COM O RESVERATROL NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

ALUNA: Camila Eufrazio de Souza¹

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho¹

¹ Universidade de Brasília - UnB

Foram realizados dois experimentos *in vitro* para análise do volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada (VCH₄/DIVMS), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV). O meio de cultura foi preparado seguindo-se as recomendações de Theodorou et al. (1994). A mensuração dos gases produzidos foi realizada às 6 e às 24 horas após o início dos experimentos, pelo deslocamento de água medido pelo aparato de vasos comunicantes, e a produção de CH₄ foi realizada por cromatografia gasosa. A DIVMS foi determinada às 24 h. O delineamento experimental de ambos os experimentos foi o inteiramente ao acaso e os resultados comparados pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. Amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e concentrado proteico (29,3% PB) foram pesadas na relação 80:20 em sacos F57 da Ankom[®] e foram usadas como tratamento controle (TC). No experimento 1 foram avaliadas duas doses (0,3 e 0,6 mL/L de solução) de óleo essencial de alho (A3, A6), canela (C3, C6), e orégano (O3, O6) e duas doses (300 e 600 mg/L de solução) de timol (T3, T6) e resveratrol (R3, R6) em pó. Para VCH₄ todos

os tratamentos diferiram ($P < 0,05$) de TC, reduzindo o volume produzido. R6 não diferiu ($P > 0,05$) de TC para DIVMS, sendo que todos os outros tratamentos aumentaram ($P < 0,05$) DIVMS. A relação $VCH_4/DIVMS$ foi reduzida ($P < 0,05$) com a adição dos metabólitos. A concentração de $N-NH_3$ não foi alterada por nenhum dos metabólitos avaliados. As concentrações dos ácidos acético, propiônico e soma AGV não foram alteradas pelo tratamento R3, enquanto todos os outros reduziram ($P < 0,05$) a concentração de ambos os ácidos, o que evidencia o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais sobre os micro-organismos ruminais. O tratamento R3 foi o que mostrou potencial para melhorar a eficiência de uso da dieta por bovinos, pois reduziu o VCH_4 sem prejudicar a DIVMS e a produção de AGV. No experimento 2 foram avaliadas as combinações entre 300 e 600 mg/L de resveratrol com 0,6 mL/L dos óleos essenciais de alho (R3A6, R6A6), canela (R3C6, R6C6) e orégano (R3O6, R6O6), e 600 mg/L de timol (R3T6, R6T6). Também foi avaliada a dose de 0,6 mL/L de todos os metabólitos sem associação com resveratrol (A6, C6, O6, T6, R6) e a menor dose de resveratrol (R3). O VCH_4 e a DIVMS reduziram ($P < 0,05$) em relação à TC para todos os tratamentos combinados ou não com o resveratrol, mas não houve efeito ($P > 0,05$) para os tratamentos R3 e R6. O $VCH_4/DIVMS$ também foi reduzido ($P < 0,05$) em relação à TC para todos os tratamentos. A concentração de $N-NH_3$ foi reduzida ($P < 0,05$) para os tratamentos R6, R6A6 e R6T6. Os tratamentos C6, A6, O6 e R3C6 aumentaram ($P < 0,05$) a concentração de $N-NH_3$. Não houve efeito, em relação à TC, na concentração de acetato, butirato e soma de AGV para os tratamentos combinados com o resveratrol, à exceção de R3C6, indicando que tais aditivos podem ser usados para melhorar a eficiência do uso da dieta de ruminantes com provável efeito tóxico sobre os micro-organismos metanogênicos.

Palavras-chaves: metabólicos secundários de plantas, óleos essenciais, produção de gás *in vitro*

ABSTRACT

EFFECT OF FIVE SECONDARY METABOLITES COMBINE OR NOT WITH RESVERATROL ON RUMINAL PARAMETERS FERMENTATION

GRADUATED STUDENT: Camila Eufrazio de Souza¹

TUTOR: Prof. Dr. Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho¹

¹University of Brasilia – UnB

Two experiments were conducted in vitro to analyze the volume of methane (VCH₄), in vitro dry matter degradability (IVDMD), volume of methane per gram of degraded dry matter (VCH₄/IVDMD), ammonia concentration (N-NH₃) and volatile fatty acids (VFA). The incubation medium was prepared following the recommendations of Theodorou et al. (1994). In vitro gas production was performed by the use of a simple apparatus for measuring gas production through communicating vessels and methane concentration was determined by gas chromatography. IVDMD were determined at 24 h. Samples of *Brachiaria brizantha* and concentrate were weighed in the ratio 80:20 into Ankom[®] filter bags (F57) and were used as the control treatment (TC). In Experiment 1, it was evaluated two doses (0.3 and 0.6 mL/L solution) of cinnamon (C3, C6), garlic (A3, A6) and oregano (O3, O6) essential oils and two doses (300 and 600 mg/L solution) of, thymol (T3, T6) and resveratrol (R3, R6) powder. All treatments differed (P<0.05) from TC for VCH₄, reducing the volume produced. R6 did not differ (P>0.05) for IVDMD compared to TC, but all the others treatments increased (P<0.05) IVDMD. The VCH₄/IVDMD ratio was reduced (P<0.05) with the addition of the secondary metabolites. N-NH₃ concentration was not altered by any of the metabolites evaluated. The concentrations of acetic, propionic and total VFA acids were not altered by treatment R3, while all others reduced (P<0.05) the concentration of both acids, which shows the antimicrobial effect of essential oils on rumen microorganisms. In experiment 2, the

combinations between 300 and 600 mg/L of resveratrol with 0.6 mL/L of cinnamon (R3C6, R6C6), garlic (R3A6, R6A6) and oregano (R3O6, R6O6) essential oils and with 600 mg/L thymol (R3T6, R6T6) were evaluated. 0.6 mL/L of all metabolites without association with resveratrol (A6, C6, O6, T6 e R6) and the lowest dose of resveratrol (R3) were also evaluated. The VCH₄ and IVDMD decreased ($P<0.05$) compared to TC for all treatments combined or not with resveratrol, but there was no effect ($P>0.05$) for R3 and R6 treatments. The VCH₄/IVDMD was also reduced ($P<0.05$) compared to TC for all treatments. The N-NH₃ concentration was reduced ($P<0.05$) for R6, R6A6 and R6T6 treatments. The C6, A6, O6 and R3C6 treatments increased ($P<0.05$) the concentration of N-NH₃. Compared to TC, there was no effect in acetate, butyrate and the sum of VFA concentrations combined with resveratrol, with the exception of R3C6 treatments, indicating that such additives can be used to improve efficiency of feed utilization by ruminants, with toxic effect on the methanogenic microorganisms.

Keywords: essential oils, in vitro gas production, plant secondary metabolites,

1. INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são um grupo químico que não estão envolvidos nos processos bioquímicos primários da planta, como crescimento e reprodução, mas são importantes para protegê-las de insetos ou predadores herbívoros (Taiz & Zeiger, 2000). Alguns deles, como compostos fenólicos e organossulfurados apresentam atividade antimicrobiana e podem ser usados contra micro-organismos ruminais produtores de metano (Busquet et al., 2005; Benchaar & Greathead, 2011).

A manipulação da microbiota ruminal para melhorar a digestibilidade dos alimentos fibrosos, reduzir a emissão de metano e a excreção de nitrogênio pelos ruminantes, são alguns dos objetivos a serem atingidos pelos nutricionistas (Bodas et al., 2008). O interesse em estudar novos produtos a serem adicionados à dieta dos ruminantes é devido não só à alternativa ao uso de antibióticos, mas também à preocupação com o aquecimento global e a poluição ambiental (Tedeschi et al., 2011).

Para melhorar a conversão alimentar dos animais que se encontram em condições de pastejo, antibióticos são fornecidos para aumentar o ganho de peso por meio de mudança na fermentação ruminal, ou seja, seleção de bactérias Gram-negativas em detrimento das Gram-positivas, proporcionando a fermentação do alimento por bactérias que promovem o acúmulo de ácido propiônico (Goulart, 2010). Entretanto, desde a proibição do uso de antibióticos na dieta dos ruminantes pela União Europeia em 2003, é crescente a procura por compostos que os substituam e que tenham o mesmo efeito na eficiência da fermentação ruminal (Tekippe et al., 2012). Ou seja, faz-se necessário a substituição de tal produto por outro com igual capacidade de modificação da fermentação ruminal, mas que também seja capaz de aumentar o ganho de peso ou a produção de leite, e ainda reduzir a produção de metano pelos ruminantes. Os chamados “aditivos naturais” têm sido estudados há alguns anos

com os objetivos de mudanças na fermentação ruminal e de redução na produção de metano (CH₄).

Durante o processo de fermentação anaeróbica dos carboidratos o metano é produzido a partir do hidrogênio e do gás carbônico gerados pelas bactérias e protozoários (Valadares Filho & Pina, 2011) e representa significativa perda de energia dietética (Beauchemin et al., 2008). Calsamiglia et al. (2007) e Benchaar et al. (2007) após extensa revisão sobre os efeitos *in vitro*, *in vivo* e *in situ*, da inclusão de óleos essenciais à dieta de ruminantes, concluíram que esses compostos podem melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes por provocarem redução na produção de metano, inibição da deaminação dos aminoácidos e mudanças na produção de ácidos graxos voláteis.

Entretanto, para o uso de plantas ou extratos de plantas como alternativa às drogas sintéticas são necessárias informações a respeito da fonte, concentração e estrutura do composto, assim como o conhecimento sobre o modo de absorção, o metabolismo e os efeitos biológicos causados nos animais (Durmic & Blache, 2012), pois os efeitos variam de acordo com o nível de substância ativa responsável pela atuação dos compostos secundários (Bodas et al., 2008).

Os objetivos desse trabalho foram avaliar *in vitro* o efeito de duas doses de cinco metabólitos secundários de plantas e suas combinações com o resveratrol, em uma dieta composta por 80% *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e 20% concentrado proteico, na produção do metano ruminal, ácidos graxos voláteis, nitrogênio amoniacal e degradabilidade do alimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Metabólitos secundários

Os óleos essenciais de canela, alho e orégano foram obtidos das plantas *Cinnamomum cassia* (canela), *Allium sativum* (alho) e *Origanum vulgare* (orégano); os metabólitos em pó timol e resveratrol foram obtidos das plantas *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Morus alba* (amora). Os metabólitos secundários foram processados pela empresa Biomin[®] e apresentaram 99% de pureza.

O experimento 1 consistiu em avaliar cinco metabólitos secundários de plantas, sendo três na forma de óleo essencial de alho (A), de canela (C) e de orégano (O) nas doses 0,3 e 0,6 ml/L de solução, e dois metabólitos em pó, timol (T) e resveratrol (R), nas doses 300 e 600 mg/L de solução. O tratamento controle foi forragem mais concentrado proteico (TC). Os respectivos metabólitos citados anteriormente, avaliados nas duas doses, foram denominados: A3 e A6; C3 e C6; O3 e O6; T3 e T6; e R3 e R6.

O experimento 2 consistiu em avaliar, a maior dose (0,6 mL/L) dos quatro metabólitos secundários, óleo essencial de canela, alho e orégano, e o timol, associados, cada um, com a menor e a maior dose (300 e 600 mg/L) do metabólito resveratrol. Os tratamentos associados a menor dose foram denominados: R3C6, R3A6, R3O6 e R3T6; os associados ao resveratrol na maior dose foram denominados da seguinte maneira: R6A6, R6C6, R6O6 e R6T6. Foram avaliados novamente todos os cinco metabólitos na maior concentração (A6, C6, O6, T6 e R6), e também o resveratrol na menor dose (R3).

2.2. Substratos e análise bromatológica

Na Tabela 1 encontram-se os resultados para análise bromatológica para a forrageira e o concentrado. Os teores de matéria seca e cinzas foram determinados pela metodologia descrito por Silva & Queiroz (2006); os teores de fibra detergente neutro e fibra detergente ácido foram determinados pelo método Van Soest et al. (2001) adaptado pela Ankom (2006). A digestibilidade *in vitro* da matéria seca para a forrageira (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) e para o concentrado foi estimada pelo método Ankom® (2005). O teor de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl.

Tabela 2.1 – Composição química da forragem e do concentrado

Composição química (%)	Substrato	
	<i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu	Concentrado
Matéria seca	91,65	89,66
Cinzas	11,01	6,69
Fibra detergente neutro	65,33	36,81
Fibra detergente ácido	37,11	5,80
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca	-	87,38
Proteína bruta	12,56	29,30

2.3. Preparo dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Analítica de Plantas (LQAP) da Embrapa Cerrados, localizada na BR 020 km 18, em Planaltina/DF. Os substratos usados foram *Brachiaria brizantha* cv. Marandu e concentrado proteico, pesados em saco F57 da Ankom®. No saco F57 pesou-se 0,5000g, sendo a proporção entre forragem e concentrado igual a 80:20.

O meio de cultura foi preparado seguindo-se as recomendações de Theodorou et al. (1994). Após a mistura dos reagentes, a solução foi mantida sob fluxo de gás carbônico (CO₂) por 1 hora, para conferir anaerobiose ao meio. O pH foi aferido e apontou aproximadamente 6,9 para os três experimentos realizados. O meio de cultura foi mantido a 39 °C até o momento da inoculação (**Figura 2.1D**).

Três bovinos fistulados foram doadores de líquido ruminal. Dois doadores eram animais cruzados e foram mantidos em pasto de *B. brizantha* cv. Marandu na Fazenda

Água Limpa (FAL), área pertencente à Universidade de Brasília, Brasília/DF e recebiam silagem para complementar a dieta a pasto. O terceiro animal, da raça Nelore, também foi mantido em pasto de *B. brizantha* em área da Embrapa Cerrados e era suplementado com 2 kg/dia de concentrado proteico, sendo o mesmo usado no tratamento controle.

Após a coleta manual do líquido ruminal dos animais da FAL, este foi filtrado por quatro camadas de gaze, armazenado em garrafa térmica e levado ao LQAP (**Figuras 2.1A, 2.1B e 2.1C**). O líquido ruminal do animal localizado na Embrapa foi coletado por um sistema a vácuo, no qual a extremidade da mangueira introduzida na fístula possuía pequenos orifícios para filtragem. Após a coleta, este foi armazenado em garrafa térmica e levado ao LAQP. No laboratório, os líquidos ruminais foram misturados entre si, filtrados por uma camada de gaze e posteriormente adicionados ao meio de cultura. Após a mistura, a solução final foi mantida em banho maria à 39 °C e procedeu-se a inoculação, sendo todo o processo descrito acima gaseificado com CO₂ (**Figuras 2.1E e 2.1F**).

2.4. Inoculação *in vitro*

A inoculação *in vitro* foi realizada em frasco âmbar de 100 mL contendo 36,4 mL de meio de cultura (solução), 13,6 mL de inóculo (líquido ruminal), 0,5000 g de substrato e o aditivo, que foi adicionado ao frasco um dia antes da inoculação. Cada frasco, foi gaseificado com CO₂, fechado com tampa de silicone e mantido em estufa à temperatura de 39 °C (**Figuras 2.1G e 2.1H**). Cada um dos tratamentos possuía amostras triplicadas.

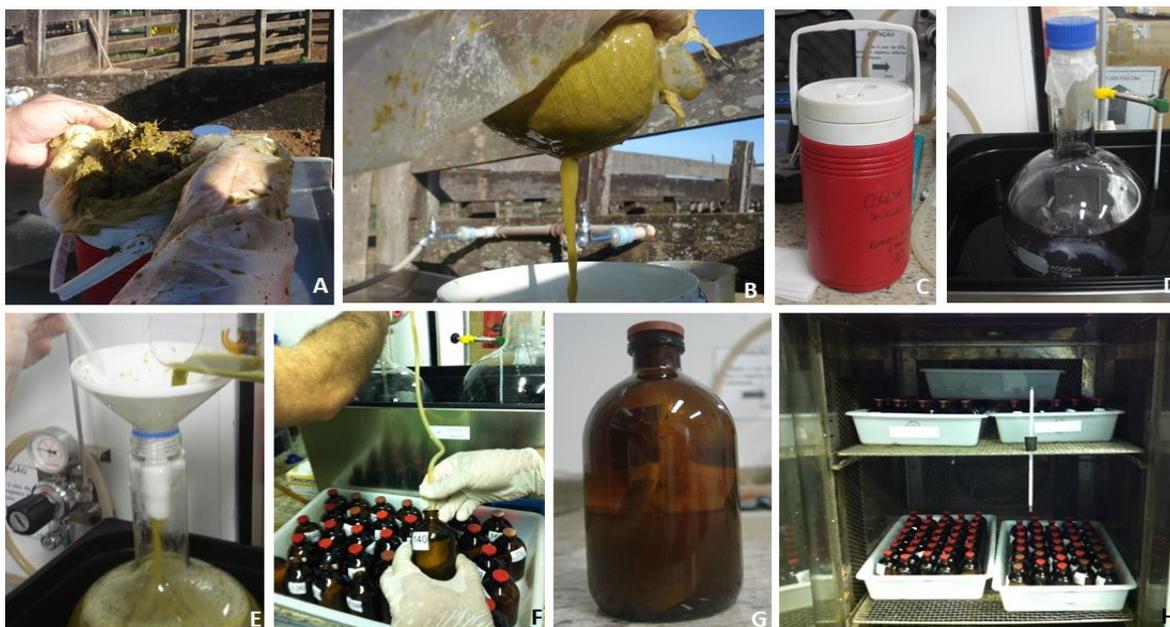


Figura 2.1. A - alimento retirado do rúmen de um bovino; B - filtragem do alimento para obtenção do líquido ruminal; C - garrafa térmica para armazenamento de líquido ruminal; D - solução de macro e micronutrientes em banho maria à 39° C; E - mistura da solução com o líquido ruminal para inoculação; F - inoculação; G – frasco âmbar com saco F57 e solução; H – bandejas com frascos em estufa à 39°C.

2.5. Mensuração e coleta de amostra da produção de gases

A mensuração dos gases produzidos foi realizada às 6 e às 24 horas após o início dos experimentos, pelo deslocamento de água medido pelo aparato de vasos comunicantes (**Figura 2.2A**) descrita por Fedorak & Hrudey (1983). As bandejas contendo os frascos âmbar permaneceram durante todo o tempo parcialmente imersas em banho maria à 39 °C. Para cada hora de mensuração, após o volume de água deslocado ser anotado, foi coletada uma alíquota dos gases por meio de uma seringa (**Figura 2.2B**); os gases eram injetados em *exetainers* à vácuo (**Figura 2.2C**).

Os gases fermentados foram analisados por cromatografia gasosa pelo equipamento Thermo modelo Trace GC Ultra. As características do detector foram: temperatura do bloco e do filamento de 180 e 240 °C, respectivamente, com o hélio usado como gás de arraste à pressão constante de 180 kPa e à 20 mL/min. As características da coluna foram: coluna empacotada com Porapak Q, I.D 2,0 mm x 2m. O injetor utilizado foi um *loop* de 0,5 MI no sistema de válvulas *backflush*. A temperatura do forno foi 85 °C e constante.

2.6. Determinação da degradabilidade *in vitro* da matéria seca

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi determinada 24 horas após o início dos experimentos. Depois de retirados dos frascos âmbar, os sacos F57 da Ankom® secaram a temperatura ambiente durante dois dias e depois foram colocados em estufa a 105°C por 3 horas e posteriormente pesados em balança analítica.



Figura 2.2. **A** – aparato de vasos comunicantes; **B** - coleta de gás para mensuração de gás metano; **C** - injeção da amostra de gás em *exetainers* de 6mL; **D** - coleta de 10 mL de solução para avaliação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) - primeiro frasco - e ácidos graxos voláteis (AGV) - segundo frasco; **E** - frascos lacrados para posterior avaliação.

2.7. Coleta de amostra e determinação dos ácidos graxos voláteis

A coleta dos ácidos graxos voláteis procedeu-se 24 horas após iniciado o experimento. Uma alíquota de 10 mL da solução era armazenada em frasco contendo 2 mL de solução de ácido metafosfórico 20% concentrada (**Figuras 13D e 13E**). As amostras foram enviadas à Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, MG e foram analisadas por cromatografia.

Características do equipamento: Waters alliance e2695 com Detector PAD 2998 (*photodiode array detector*), sistema de separação constituído de coluna de fase reversa C18 ODS 80A (150 x 4,6 mm x 5 µm). As condições de análise foram: fase móvel com mistura isocrática constituída de 90% de solução aquosa ácida de ácido fosfórico pH 2,35-2,55 e 10% de metanol, temperatura do forno de 25 ± 5 °C, volume de injeção de amostra de

20 microlitros, corrida com 12 minutos e detector com comprimento de onda de excitação em 210 nm. A quantificação foi obtida por curva de calibração com uso de padrões externos.

2.8. Coleta de amostra e determinação do nitrogênio amoniacal

A coleta de amostras para determinação do nitrogênio amoniacal também foi realizada às 24 horas. Uma alíquota de 10 mL da solução fermentada foi armazenada em um frasco contendo 1mL de ácido sulfúrico na concentração de 50% (**Figuras 2D e 2E**). As amostras foram avaliadas no Laboratório de Análise de Alimentos da UnB, seguindo o método da destilação de Kjeldahl descrito por Detmaan et al. (2012).

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental dos experimentos foi o inteiramente ao acaso, com cinco tratamentos e três repetições. Os dados para volume de metano, volume de metano por matéria seca degradada *in vitro*, degradabilidade *in vitro* da matéria seca, ácidos graxos voláteis, e nitrogênio amoniacal foram submetidos à análise de variância utilizando o GLM Procedure do programa estatístico SAS (2001). Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2.1 encontram-se os resultados para volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada *in vitro* (VCH₄/DIVMS) do experimento 1. Todos os tratamentos reduziram VCH₄ e VCH₄/DIVMS e diferiram (P<0,05) do tratamento controle (TC). Entre a maior e a menor dose, para o óleo essencial (O.E) de canela e para o resveratrol e o timol, a maior dose reduziu mais VCH₄.

Somente R6 não diferiu (P>0,05) de TC para DIVMS; os demais tratamentos aumentaram a DIVMS. Esses valores estão próximos aos valores de digestibilidade da matéria seca encontrados por Tibo et al. (2000) e Costa et al. (2005). Os primeiros autores trabalharam com mestiços alimentados com 75% de concentrado e 25% de feno de *B. decumbens* e *Cynodon dactylon* e encontram digestibilidade de 62%. Costa et al. (2005), em trabalho com novilhos zebuínos alimentados com silagem de capim *B. brizantha* e concentrado encontraram digestibilidade de 69%.

O VCH₄/DIVMS apresentou diferença (P<0,05) entre as doses nos tratamentos com canela e resveratrol, sendo a menor relação referente a maior dose (0,6 ml/L e 600 mg/L, respectivamente). Os tratamentos O3, O6, T3 e T6 não diferiram entre si (P>0,05) para VCH₄/DIVMS e para DIVMS. Os tratamentos O6 e T3 diferiram entre si (P<0,05) para VCH₄, sendo que O6 inibiu mais o VCH₄ produzido. O O.E de orégano é proveniente do *Origanum vulgare* e possuiu moléculas de timol e de carvacrol em sua composição (Benchaar & Greathead, 2011) que são as principais responsáveis pelo seu efeito antimicrobiano (Lambert et al., 2001). O timol isolado pode não ser tão efetivo na redução do CH₄ quanto a combinação entre ele e o carvacrol. García-García et al. (2011) ao testarem o efeito isolado do carvacrol e do timol sobre a *Listeria innocua* obtiveram melhores resultados para o primeiro composto. No trabalho desses autores, o efeito binário carvacrol mais timol, foi mais efetivo

para inativar o crescimento da bactéria, evidenciando o efeito sinérgico entre as duas moléculas.

Tabela 2.1 - Volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada *in vitro* (VCH₄/DIVMS), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e diferenças em relação ao tratamento controle (TC), no experimento 1

Trat.*	VCH ₄ (mL)		DIVMS (%)		VCH ₄ / DIVMS (mL/g)		N-NH ₃ (mg/L)	
	≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)	
TC	2,85 ^a	-	60,42 ^g	-	22,19 ^a	-	3,34 ^{ab}	-
A3	0,96 ^{cd}	-66,24	69,30 ^{ef}	14,70	6,53 ^{cd}	-70,59	3,88 ^a	16,35
A6	0,64 ^{de}	-77,65	72,32 ^{de}	19,70	4,14 ^{de}	-81,35	3,27 ^{ab}	-1,92
C3	1,28 ^c	-55,02	72,75 ^{cde}	20,41	8,30 ^c	-62,58	3,50 ^{ab}	4,81
C6	0,54 ^{efg}	-80,90	75,14 ^{abcd}	24,36	3,41 ^{de}	-84,62	3,34 ^{ab}	0
O3	0,53 ^{efg}	-81,32	76,30 ^{abc}	26,28	3,28 ^{de}	-85,21	3,08 ^b	-7,69
O6	0,15 ^g	-94,84	77,78 ^a	28,73	0,89 ^e	-95,99	3,11 ^b	-6,73
R3	1,77 ^b	-37,77	66,52 ^f	10,10	12,53 ^b	-43,55	2,86 ^b	-14,42
R6	0,58 ^{def}	-79,57	57,45 ^g	-4,92	4,79 ^d	-78,43	2,92 ^b	-12,50
T3	0,66 ^{de}	-76,66	74,01 ^{bcd}	22,49	4,23 ^{de}	-80,93	2,98 ^b	-10,58
T6	0,22 ^{fg}	-92,25	77,19 ^{ab}	27,76	1,35 ^e	-93,93	2,79 ^b	-16,35
CV (%)	15,25		1,79		17,76		7,80	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo teste de Tukey.

*TC: tratamento controle; óleos essenciais de alho (A), canela (C) e orégano (O) nas doses 0,3 e 0,6 mL/L; e metabólitos em pó resveratrol (R) e timol (T) nas doses e 300 e 600 mg/L.

Não houve diferença estatística entre O3, R6, T3 (compostos fenólicos), C6 (composto fenilpropanóide), e A6 (composto sulfurado) para VCH₄ e VCH₄/DIVMS. Os compostos citados apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sikkema et al., 1995, Helander et al., 1998, Ultee et al., 2002, Gill e Holey, 2004, Brown et al., 2009, Fujisawa et al., 2009) e apresentam diferentes modos de ação. Os mecanismos de ação pelos quais os compostos fenólicos exercem seus efeitos antibacterianos são pela desestabilização da membrana, pela dispersão da força próton-motriz, pelo vazamento de componentes celulares como o ATP, e pela troca de cátions monovalentes trans-membrana (Sikkema et al., 1995; Ultee et al., 2002). Já o fenilpropanóide cinamaldeído interage com a membrana da célula, mas somente a desestabiliza para provocar o vazamento

de pequenos íons, sem deixar vaziar o ATP, como observado por Helander et al. (1998). Os compostos sulfurados encontrados no O.E de alho interagem com as proteínas hidrofóbicas presentes na parede celular das bactérias, com consequente desdobramento da estrutura da proteína (Münchberg et al., 2007).

Macheboeuf et al. (2008) examinaram O.E de tomilho (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*) e canela (*Cinnamomum verum*), e seus constituintes puros timol, carvacrol e cinamaldeído, extraídos cada um, respectivamente, das plantas citadas. Os seis tratamentos foram comparados com seus respectivos tratamentos controle, que eram sem adição dos aditivos. Para o O.E de canela e seu principal composto antimicrobiano, o cinamaldeído, concentrações menores que 3 mmol/L não afetaram a produção de CH₄, porém para 5 mmol/L não houve produção desse gás, devido ao acúmulo de hidrogênio no *headspace* do *vial*. De acordo com os autores, os O.E de tomilho e de orégano, o timol e o carvacrol foram mais tóxicos aos micro-organismos ruminais em relação ao cinamaldeído e O.E canela, pois foi necessária menor dose para inibir a produção de CH₄. Para os respectivos compostos citados, 1; 2; 1,5; e 1,5 mmol/L, apresentaram-se como sendo as doses limites capazes de inibirem a produção de CH₄.

Busquet et al. (2005) avaliaram 300 mg/L de O.E de alho na produção de CH₄ e observaram redução de 73,62% em relação ao tratamento controle e pouco desaparecimento (17%) da matéria seca (MS). Castro-Montoya et al. (2012) relataram redução de 70 e 90% para as respectivas doses de 150 e 300 mg/L na produção de CH₄. No experimento 1, 0,3 e 0,6 mL/L de O.E de alho reduziram em 66,2 e 77,6% o VCH₄ e aumentaram degradabilidade da MS em 14,7 e 19,7%. Busquet et al. (2005) relataram que o mecanismo de ação do O.E de alho sobre os micro-organismos metanogênicos *Archaea* pode estar relacionado à inibição da enzima 3-hidroxil-3metil-glutaril-coenzima-A redutase pelos compostos organossulfurados. Em relação à degradabilidade, a redução volume de metano sem afetar a degradabilidade do alimento é importante, pois, de acordo com Salman et al. (2010), a cinética de degradação é, dentre vários fatores nutricionais, considerada um fator que interfere no desempenho animal. Alimentos com baixa degradabilidade podem dificultar a extração de substratos pelos micro-organismos ruminais e, conseqüentemente, resultar em limitação de nutrientes para o animal (Van Soest, 1990).

Nenhum tratamento diferiu estatisticamente do tratamento TC para N-NH₃ (Tabela 2.1). Benchaar et al. (2007) também não observaram efeito do O.E de canela (400 mg/L) e orégano (200 mg/L) e timol (200 mg/L; pureza > 99%) na concentração do N-NH₃ em relação ao tratamento sem adição de aditivo. Cardozo et al. (2005) testaram doses menores

em relação ao presente trabalho e ao trabalho de Benchaar et al. (2007) de O.E de alho, de canela e de orégano (0,3 mg/L) e também não observaram diferença estatística em relação ao tratamento controle para nenhum dos O.E testados. Porém doses mais elevadas (30 e 300 mg/L) reduziram a concentração de amônia em 32,7 e 55,4% (O.E de alho), 31,6 e 61,9% (O.E de canela) e em 26,9 e 64,5% (O.E de orégano), respectivamente para as doses citadas. Segundo os autores, esses resultados sugerem que esses aditivos decresceram a atividade de deaminase ou que os micro-organismos utilizaram os peptídeos e os AA como fonte de nitrogênio, com consequente redução no N-NH₃.

Estudos sugerem que o efeito de O.E no metabolismo ruminal da proteína seja no último passo de catabolismo das proteínas, que é a quebra dos AA em NH₃ (deaminação) (Wallace 2004) e esse efeito pode ser devido a inibição de bactérias produtoras de amônia (McIntosh et al., 2003). Newbold et al. (2004) avaliaram *in vitro* uma mistura de óleos essenciais (CRINA[®] Ruminants), composta por timol, guaiacol e limoneno, sobre a atividade proteolítica, peptidolítica e deaminase dos micro-organismos ruminais. A atividade de deaminase foi determinada com caseína hidrolisada. Os autores relataram que somente a atividade de deaminação foi afetada pelo O.E, pois a degradação da caseína hidrolisada foi reduzida em 24%, enquanto que as atividades proteolíticas e peptidolíticas não foram afetadas.

Na Tabela 2.2 encontram-se os dados referentes às concentrações dos ácidos graxos voláteis (AGV) acético, propiônico e butírico. Os tratamentos C3, A3, A6 e R3 não diferiram de TC para a concentração de ácido butírico, tendo os demais reduzido a concentração entre 25,4 e 47,8%. Somente R3 não diferiu (P>0,05) de TC para as concentrações dos ácidos acético e propiônico e para a soma do AGV (SAGV); todos os demais reduziram a concentração dos dois ácidos citados e SAGV. Assim como nesse experimento, Cardozo et al. (2005) observaram que 300 mg/L de O.E de alho, de canela e de orégano reduziram em 22,2; 24,9; 56,3% a concentração total de AGV, concluindo que tais substâncias não têm efeito benéfico na mudança do perfil de fermentação ruminal. Segundo Benchaar et al. (2007), os compostos fenólicos têm alta atividade contra os micro-organismos ruminais e isso pode provocar efeitos adversos na nutrição animal, caso os mesmos resultados sejam observados *in vivo*, pois os AGVs representam a principal fonte de energia para os ruminantes. Contudo, esses mesmo autores não observaram redução na concentração AGV ao analisarem O.E de orégano e de canela e o composto puro timol (200, 400 e 200 mg/L, respectivamente).

Tabela 2.2 – Concentração ($\mu\text{mol/mL}$) dos ácidos acético, propiônico e butírico e soma dos ácidos graxos voláteis (SAGV), e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e diferenças em relação ao tratamento controle (TC), no experimento 1

Trat.	Acético		Propiônico		Butírico		SAGV	
	≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)	
TC	33,68 ^a	-	10,99 ^a	-	5,75 ^a	-	50,41 ^a	-
A3	29,35 ^{bc}	-12,85	7,03 ^b	-36,02	4,87 ^{abc}	-15,33	41,25 ^b	-18,18
A6	28,24 ^{cde}	-16,13	6,91 ^{bc}	-37,18	4,95 ^{ab}	-13,83	40,10 ^b	-20,46
C3	28,88 ^{bcd}	-14,23	6,83 ^{bc}	-37,90	5,04 ^{ab}	-12,27	40,75 ^b	-19,16
C6	28,81 ^{bcde}	-14,45	6,06 ^{bcd}	-44,85	4,28 ^{bcd}	-25,42	39,16 ^{bc}	-22,33
O3	27,21 ^{cde}	-19,19	5,75 ^{cd}	-47,64	3,99 ^{cd}	-30,64	36,96 ^{bcd}	-26,70
O6	25,42 ^{cdef}	-24,52	5,14 ^d	-53,28	3,43 ^{de}	-40,28	33,99 ^{cde}	-32,59
R3	32,57 ^{ab}	-3,28	10,99 ^a	-0,02	5,26 ^a	-8,54	48,81 ^a	-3,17
R6	22,80 ^f	-32,30	5,11 ^d	-53,55	3,00 ^e	-47,76	30,91 ^e	-38,69
T3	24,60 ^{ef}	-26,96	5,08 ^d	-53,80	3,43 ^{de}	-40,33	33,10 ^{de}	-34,34
T6	24,97 ^{def}	-25,85	5,40 ^d	-50,85	3,44 ^{de}	-40,10	33,82 ^{cde}	-32,92
CV (%)	5,24		6,10		7,40		5,21	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem ($P < 0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

*TC: tratamento controle; óleos essenciais de alho (A), canela (C) e orégano (O) nas doses 0,3 e 0,6 mL/L; e metabólitos em pó resveratrol (R) e timol (T) nas doses e 300 e 600 mg/L.

Busquet et al. (2005) testaram quatro diferentes doses (3, 30, 300, 3000 mg/L) de O.E de alho na produção de AGV. A menor dose (3 mg/L) não alterou as concentrações dos ácidos acético, propiônico e butírico e a SAGV em relação ao tratamento controle, que era sem adição do O.E. As doses de 30 e 300 mg/L tiveram efeito positivo na produção dos ácidos, pois aumentou a produção de ácido propiônico e reduziu a de ácido acético, porém 300 mg/L reduziu a SAGV. 3000 mg/L reduziu AGV e o ácido propiônico em 25,26 e 8,27%, respectivamente, e aumentou em 46,56% a concentração de butirato. Assim como Busquet et al. (2005), Castillejos et al. (2008) também observaram efeitos diferentes na concentração de AGV de acordo com as doses (5, 50 e 500 mg/L). Para esses autores, doses menores (5, 50 mg/L) podem ajudar a melhorar a eficiência de fermentação por terem aumentado a concentração total de AGV, ao contrário da dose de 500 mg/L, que reduziu em 17% a concentração total de AGV.

É interessante avaliar não só o efeito da dose dos metabólitos secundários em cada parâmetro ruminal, mas também as consequências da influência que um parâmetro tem

no outro. Após a ingestão de forragem pelos ruminantes há a produção de AGV e CH₄, com o primeiro sendo destinado à produção de energia (Nussio et al., 2011) e o segundo um produto final da reação entre H₂ e CO₂, sendo eructado pelo ruminante (Bodas et al., 2012). O NH₃ é fonte de nitrogênio para a síntese de proteína microbiana (Pmic) (Russell et al., 1992) e caso seu fornecimento ao animal seja insuficiente, pode prejudicar a síntese de Pmic e, conseqüentemente, reduzir a produção de AGV (Silveira et al., 2002). Contudo, as propriedades dos O.E podem causar redução na degradação da proteína no ambiente ruminal e assim aumentar a proteína de escape (Wallace et al., 2002).

Um metabólito secundário pode ter efeito benéfico contra as bactérias produtoras CH₄, mas também reduzir a concentração de AGV, como observado nesse trabalho para os tratamentos com canela, alho, orégano e timol. De acordo com Nussio et al. (2011), há uma relação inversa entre a produção de propionato e CH₄, uma vez que o CO₂ e o H₂ são subprodutos da conversão da glucose em acetato e butirato e ambos são precursores da produção de CH₄. Para formação de propionato, há utilização de H₂, não deixando-o disponível para as bactérias metanogênicas (Nussio et al., 2011). Com base nisso, o tratamento R3 mostrou-se como o menos prejudicial a produção de AGVs, pois não diferiu do TC para SAGV e para ácido propiônico, reduziu o VCH₄ em 38% e não alterou a DIVMS. Todo os demais tratamentos também foram efetivos em reduzir CH₄, porém reduziram a SAGV entre 19 e 38%, e o ácido propiônico entre 36 e 53,8%.

No presente trabalho, ambas as doses dos tratamentos com O.E de alho, canela, e orégano, e o timol não diferiram estatisticamente entre si para DIVMS, VCH₄/DIVMS, N-NH₃ e SAGV; a menor dose dos respectivos metabólitos citados acima reduziu entre 55,0 e 81,3% o VCH₄, indicando que a menor dose mostrou-se efetiva em modificar os parâmetros ruminais. Macheboeuf et al. (2008) também observaram que pequena dose de O.E de canela (3 mmol/L) já inibiu a produção de CH₄ (26,32%), porém afetou pouco a concentração de N-NH₃ (-15,45%) e AGV (-14,30%); 5 mmol/L de O.E de canela reduziu em 98% CH₄, contudo a produção de AGV caiu 63%. Esses autores relataram que 3 mmol/L de timol reduziu o volume de CH₄ e as concentrações de N-NH₃ e AGV em, respectivamente, 84; 60; e 84%; e 3 mmol/L de O.E de orégano reduziu os respectivos parâmetros acima em 63; 53; e 68%. Segundo os autores a redução na concentração de amônia deve ser tal que permita a utilização do nitrogênio no rúmen sem afetar a produção de AGV ou outros parâmetros fermentativos.

A3 e A6 não diferiram (P>0,05) entre si para VCH₄, N-NH₃ e SAGV, porém diferiram do TC, com redução no VCH₄ e na SAGV. Chaves et al. (2007) ao avaliarem o efeito do O.E de alho nas doses 100 mL/L e 250 mL/L também observaram redução no CH₄ (-

69,86 e -71,91%, respectivamente), porém houve aumento na concentração de N-NH₃ de 64,78 e 14,35% para as respectivas doses e pouco efeito na SAGV (-0,4% ambas as doses).

O efeito dos óleos essenciais no CH₄, AGV e no metabolismo do nitrogênio diferem com a dose, com a composição química do óleo essencial (Busquet et al., 2006), variações na química e condições de crescimento da planta, e no preparo do óleo (Macheboeuf et al., 2008).

No experimento 2 foi avaliado o efeito da combinação de 300 e 600 mg/L de resveratrol com a maior dose dos O.E de canela, alho e orégano (0,6 mL/L) e com o timol (300 mg/L). Pode-se observar na Tabela 2.3 que o tratamento TC foi o que mais produziu CH₄ e teve a maior relação VCH₄/DIVMS, seguido pelos tratamentos R3 e R6. Entretanto, os três não diferiram (P>0,05) para DIVMS, apresentando os menores resultados. Os demais tratamentos (canela, alho, orégano e timol) não diferiram entre si para VCH₄ e VCH₄/DIVMS e foram os tratamentos que apresentaram maior DIVMS. Também neste ensaio não houve diferença estatística entre os compostos fenólicos e os compostos fenilpropanóide e sulfurado para VCH₄ e VCH₄/DIVMS.

González et al. (2011) avaliaram, *in vitro*, o efeito da inclusão de 30% de quatro variedades de *Morus alba* na população microbiana e nos produtos da fermentação de líquido ruminal extraído de búfalos. O tratamento controle era constituído de 100% de *Cynodon nlemfuensis*. Os autores observaram que nenhuma das variedades apresentou variação na população de bactérias celulolíticas e proteolíticas e na população de fungos celulolíticos, concluindo que não houve efeito negativo na degradação da fibra. Para concentração de N-NH₃, não houve diferença estatística em relação ao tratamento controle.

No presente trabalho, para N-NH₃ (Tabela 2.3), os tratamentos A6, C6, R3C6 e O6 aumentaram (P<0,05) a concentração de N-NH₃; R6, R6A6 R6T6 reduziram (P<0,05) a concentração. Como já dito anteriormente, a redução na concentração de N-NH₃ pode ser favorável, pois pode ocorrer aumento na proteína de escape; o aumento de N-NH₃ também pode ter efeito positivo se as concentrações de nitrogênio for um fator limitante à síntese de Pmic, dependendo da dieta (Cardozo et al., 2005). Entretanto, Macheboeuf et al. (2008) observaram em seu trabalho, que doses muito altas de O.E de cinamaldeído e timol aumentaram a concentração de N-NH₃ devido à provável lise das bactérias produtoras de amônia, pois as funções fermentativas pararam após 16h de fermentação.

Becker & Wikselaar (2011) testaram o efeito de 50 µmol de resveratrol no CH₄ e no AGV e observaram eficiente redução na produção de CH₄, porém relataram que a concentração de AGV foi menor do que nos frascos em branco, concluindo que o resveratrol

inibiu ou retardou a fermentação do substrato. No experimento 2, os tratamentos não diferiram entre si para os ácidos acético e butírico. A síntese de ácido butírico ocorre por duas vias, sendo que uma delas utiliza duas moléculas de acetato para formação de butirato (Antunes et al., 2011). A síntese de butirato a partir do acetato, embora sem benefícios para as bactérias, resulta na regeneração de co-fatores oxidados, o que permite o prosseguimento do processo fermentativo (Antunes et al., 2011). Para o ácido propiônico, somente o tratamento R6 diferiu de TC, aumentando seu valor em 71%.

Tabela 2.3 - Volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada *in vitro* (VCH₄/DIVMS), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e diferenças em relação ao tratamento controle, no experimento 2

Trat.**	VCH ₄ (mL)		DIVMS (%)		VCH ₄ / DIVMS (mL/g)		N-NH ₃	
	≠ (%)	≠ (%)	≠ (%)	≠ (%)	≠ (%)	≠ (%)	≠ (%)	
TC	2,00 ^a	-	47,43 ^e	-	4,34 ^a	-	2,29 ^{def}	-
R3	1,19 ^b	-40,38	53,45 ^e	12,69	2,59 ^b	-40,38	2,29 ^{def}	0,00
R6	1,38 ^b	-30,93	52,00 ^e	9,64	3,00 ^b	-30,92	1,83 ^h	-19,98
A6	0,28 ^c	-85,91	64,66 ^{bcd}	36,33	0,61 ^c	-85,90	2,62 ^{ab}	14,74
R3A6	0,20 ^c	-90,11	61,67 ^d	30,02	0,43 ^c	-90,09	2,36 ^{cdef}	3,15
R6A6	0,18 ^c	-90,86	62,32 ^{cd}	31,39	0,40 ^c	-90,83	2,00 ^{gh}	-12,64
C6	0,43 ^c	-78,36	68,67 ^{ab}	44,78	0,94 ^c	-78,37	2,77 ^a	21,08
R3C6	0,06 ^c	-97,00	68,11 ^{abc}	43,60	0,13 ^c	-97,01	2,55 ^{abc}	11,59
R6C6	0,08 ^c	-96,20	69,11 ^{ab}	45,71	0,17 ^c	-96,20	2,22 ^{efg}	-3,15
O6	0,11 ^c	-94,55	71,89 ^a	51,57	0,24 ^c	-94,54	2,55 ^{abc}	11,59
R3O6	0,07 ^c	-96,35	71,82 ^a	51,42	0,16 ^c	-96,34	2,43 ^{bcd}	6,34
R6O6	0,11 ^c	-94,50	71,23 ^a	50,18	0,24 ^c	-94,47	2,22 ^{efg}	-3,15
T6	0,08 ^c	-95,80	70,34 ^{ab}	48,30	0,18 ^c	-95,81	2,50 ^{bcd}	9,49
R3T6	0,004 ^c	-99,80	71,08 ^a	49,86	0,01 ^c	-99,79	2,14 ^{fg}	-6,30
R6T6	0,06 ^c	-97,25	70,94 ^a	49,57	0,12 ^c	-97,28	1,81 ^h	-21,03
CV (%)	37,38		3,20		37,38		3,30	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo teste de Tukey.

* não houve diferença estatística entre os tratamentos.

**TC: tratamento controle; óleos essenciais de alho (A), canela (C) e orégano (O) na dose 0,6 mL/L; metabólito em pó timol (T) na dose 600 mg/L; e resveratrol (R) nas doses 300 e 600 mg/L.

Pode-se observar na Tabela 2.3 que todos os tratamentos não associados ao resveratrol, ou seja, O.E de alho, canela, orégano e timol, e aqueles associados à menor ou maior dose de resveratrol, diferiram ($P<0,05$) dos tratamentos R3 e R6, indicando que as associações e os O.E e o timol foram mais efetivos em reduzir o VCH_4 . Contudo, a DIVMS foi maior e manteve-se semelhante àquelas obtidas por Tibo et al. (2000) e Costa et al. (2005). Quanto à relação VCH_4 /DIVMS, também foi reduzida com a adição dos metabólitos secundários, indicando melhora na eficiência de uso da dieta.

Tabela 2.4 - Concentração ($\mu\text{mol/mL}$) dos ácidos acético, propiônico e butírico e soma dos ácidos (SAGV), e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e diferenças em relação ao tratamento controle, no experimento 2

Trat.	Acético		Propiônico		Butírico*		SAGV	
	≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)	
TC**	24,53 ^a	-	7,76 ^{abcd}	-	3,78	-	36,07 ^{ab}	-
R3	23,61 ^a	-3,75	8,77 ^{abcd}	12,98	3,91	3,39	36,29 ^{ab}	0,60
R6	23,11 ^{ab}	-5,81	13,27 ^a	71,03	4,56	20,59	40,93 ^a	13,49
A6	20,65 ^{ab}	-15,82	5,43 ^{bcd}	-30,02	3,57	-5,53	29,65 ^{ab}	-17,80
R3A6	18,75 ^{ab}	-23,59	5,17 ^{cd}	-33,37	4,25	12,46	28,16 ^{ab}	-21,92
R6A6	20,02 ^{ab}	-18,4	7,90 ^{abcd}	1,84	5,18	37,02	33,10 ^{ab}	-8,24
C6	18,53 ^{ab}	-24,45	4,90 ^{cd}	-36,83	5,31	40,62	28,75 ^{ab}	-20,30
R3C6	15,60 ^b	-36,43	3,67 ^d	-52,75	4,36	15,48	23,63 ^b	-34,50
R6C6	18,67 ^{ab}	-23,89	8,46 ^{abcd}	9,01	4,78	26,36	31,90 ^{ab}	-11,55
O6	19,00 ^{ab}	-22,54	4,80 ^{cd}	-38,08	4,55	20,27	28,35 ^{ab}	-21,40
R3O6	20,49 ^{ab}	-16,47	4,48 ^d	-42,31	4,59	21,54	29,56 ^{ab}	-18,05
R6O6	21,08 ^{ab}	-14,07	8,70 ^{abcd}	12,14	3,04	-19,48	32,82 ^{ab}	-9,00
T6	19,31 ^{ab}	-21,28	5,39 ^{bcd}	-30,52	3,32	-12,07	28,02 ^{ab}	-22,30
R3T6	20,78 ^{ab}	-15,3	10,11 ^{abc}	30,29	1,80	-52,50	32,68 ^{ab}	-9,39
R6T6	22,19 ^{ab}	-9,55	10,99 ^{ab}	41,68	4,61	21,86	37,79 ^a	4,76
CV (%)	11,96		23,45		32,49		13,69	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem ($P<0,05$) entre si pelo teste de Tukey.

* não houve diferença estatística entre os tratamentos.

**TC: tratamento controle; óleos essenciais de alho (A), canela (C) e orégano (O) na dose 0,6 mL/L; metabólito em pó timol (T) na dose 600 mg/L; e resveratrol (R) nas doses 300 e 600 mg/L.

Em relação à produção de AGV, nenhum tratamento diferiu ($P>0,05$) de TC para concentração dos ácidos acético, butírico e SAGV. Quanto ao ácido propiônico, R6 foi o

único tratamento que aumentou significativamente ($P < 0,05$) a concentração desse ácido, sendo que os demais não alteraram estatisticamente sua concentração. Cardozo et al. (2005), Benchaar et al. (2007), Castillejos et al. (2008) e Macheboeuf et al. (2008), diferente do presente experimento, encontraram valores que reduziram a concentração de AGV. Para esses autores, a adição *in vitro* de altas doses de óleos essenciais à dieta de ruminantes podem não apresentar efeitos positivos na fermentação ruminal por reduzirem a concentração de AGV e, se tais efeitos forem expressos *in vivo*, a produção animal pode ser prejudicada. Contudo, no presente experimento, a redução no VCH₄ sem alteração na concentração de AGV, indicam que a combinação desses metabólitos pode ser usada como aditivos que melhoram a eficiência de uso da dieta dos ruminantes.

4. CONCLUSÕES

No experimento 1, todos os metabólitos nas doses avaliadas, à exceção do tratamento R3, não exerceram benefícios à fermentação ruminal. R3 foi o único tratamento que não alterou a concentração de AGV em relação ao tratamento controle, mostrando-se promissor em melhorar a eficiência de uso da dieta por bovinos.

Para o experimento 2, os O.E de alho, canela e orégano, e o timol, associados tanto à menor quanto à maior dose de resveratrol, mostraram-se promissores para uso na dieta de bovinos com o objetivo de reduzir a produção de CH₄, sem afetar a concentração de AGV e aumentado a DIVMS, com provável efeito tóxico sobre os micro-organismos metanogênicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANKOM, Technology. **Method 3: *In vitro* true digestibility using the DAISYII Incubator.** 2005. Disponível em: <http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf>. Acesso em 20 de junho de 2014.

ANTUNES, R.C.; RODRIGUEZ, N.M.; SALIBA, E.O.S. Metabolismo dos carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes.** 2^a ed. Jaboticabal: Funep, p.239-264, 2011.

BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, D.M.; O'MARA, F. et al. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 21–27, 2008.

BECKER, P.M.; van WIKSELAAR, P.G. Effects of plant antioxidants and natural vicinal diketones on methane production, studied *in vitro* with rumen fluid and a polylactate as maintenance substrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 170, p. 201-208, 2011.

BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V. et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2007.

BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.V. et al. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 209-228, 2007.

BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science Technology**, v. 166-167, p. 338-355, 2011.

BENCHAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science Technology**, v. 166-167, p. 338-355, 2011.

BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M. et al. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 245-258, 2008.

BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M. et al. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 245-258, 2008.

BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 78–93, 2012.

BROWN, J. C.; HUANG, G.; HALEY-ZITLIN, V. et al. Antibacterial Effects of Grape Extracts on *Helicobacter pylori*. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n.3, p. 848-852, 2009.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4393-4404, 2005.

BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 761-771, 2006.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W. et al. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. et al. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 2572-2579, 2005.

CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; MARTÍN-TERESO, J. et al. *In vitro* evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 259-270, 2008.

CASTRO-MONTOYA, J.; DE CAMPENEERE, S.; VAN RANST, G. et al. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on in vitro methane and VFA production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 47-60, 2012.

COSTA, M.A.L.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Desempenho, digestibilidade e características de carcaça de novilhos zebuínos alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.1, p.268-279, 2005.

DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: effect on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 150-162, 2012.

FEDORAK, P.M.; HRUDEY, S. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. **Environmental Technology Letters**, v. 4, p. 425-432, 1983.

FUJISAWA, H.; WATANABE, K.; SUMA, K. et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 73, n. 9, p. 1948-1955, 2009.

GARCÍA-GARCÍA, R.; LÓPEZ-MALO, A; PALOU, E. Bactericidal action of binary and ternary mixtures of carvacrol, thymol, and eugenol against *Listeria innocua*. **Journal of Food**

Science, v.76, n.2, p. 95-100, 2011.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 10, p. 5750-5755, 2004.

GONZÁLEZ, N.; GALINDO, J.; ADANA, A.I. et al. Effect of four mulberry (*Morus alba* Linn.) varieties on microbial population and fermentative products with rumen liquid from river buffaloes (*Bubalus bubalis*) under *in vitro* conditions. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 45, n. 4, 2011.

HELANDER, I. M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

MACHEBOEUF, D.; MORGAI, D.P.; PAPO, Y. et al. Dose–response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 335-350, 2008.

MCINTOSH, F.M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p. 5011–5014, 2003.

MÜNCHBERG, U.; ANWAR, A.; MECKLENBURG, S. Polysulfides as biologically active ingredients of garlic. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 5, p. 1505–1518, 2007.

NEWBOLD, C.J.; MCINTOSH, F.M.; WILLIAMS, P. et al. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 105-112, 2004.

NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M.L.M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). **Nutrição de ruminantes**. 2ª ed. Jaboticabal: Funep, p.183-228, 2011.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3551-3561, 1992.

SALMAN, A.K.D.; FERREIRA, A.C.D.; SOARES, J.P.G. et al. **Metodologias para avaliação de alimentos para ruminantes domésticos**. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2010, 26p. (Embrapa Rondônia. Documentos, 136).

SAS – Statistic Analyses System. Institute Inc. Statistical Analysis System Introductory Guide for Personal Computers. Release. Cary, (NC: SAS Institute Inc.), 2001.

SHRIKANTA, A.; KUMAR, A.; GOVINDASWAMY, V. Resveratrol content and antioxidant properties of underutilized fruits. **Journal of Food Science and Technology**, 2013.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201–222, 1995.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235 p.

SILVEIRA, R.N.; BERCHIELLI, T.T.; FREITAS, D. et al. Fermentação e degradabilidade ruminal em bovinos alimentandos com resíduos de mandioca e cana-de-açúcar ensilados com polpa cítrica peletizada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 793-801, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TEDESCHI, L.O.; CALLAWAY, T.R.; MUIR, J.P. et al. Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 291-309, 2011.

THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 185-197, 1994.

TIBO, G.C.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Níveis de concentrado em dietas de novilhos mestiços F1 Simental x Nelore. 1. Consumo e digestibilidades. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 910-920, 2000.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p. 1561–1568, 2002.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S. Fermentação ruminal. In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 616.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2ed. Ithaca, NewYork: Cornell University Press, 1994. 476p.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3583-3597, 1991.

WALLACE, R.J.; McEWAN, N.R.; McINTOSH, F.M. et al. Natural Products as Manipulators of Rumen Fermentation. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.15, n. 10, p. 1458-1468, 2002.

WALLACE, R.J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 621–629, 2004.

CAPÍTULO 3

RESUMO

EFEITO DE EXTRATOS DE PLANTAS, BARBATIMÃO E SUCUPIRA, NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL

ALUNA: Camila Eufrazio de Souza¹

ORIENTADOR: Prof. Dr. Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho

¹ Universidade de Brasília - UnB

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito de extratos de plantas do cerrado, barbatimão e sucupira, no volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada (VCH₄/DIVMS), e nas concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e de ácidos graxos voláteis (AGV). O meio de cultura foi preparado seguindo-se as recomendações de Theodorou et al. (1994). A mensuração dos gases produzidos foi realizada às 6 e às 24 horas após o início dos experimentos, pelo deslocamento de água medido pelo aparato de vasos comunicantes. DIVMS foi determinada às 24 h. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso e os resultados comparados pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade. Amostras de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu foram usadas como tratamento controle (TC). As doses avaliadas foram 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L de solução para barbatimão (B100, B200, B300, B400 e B600) e para sucupira (S100, S200, S300, S400 e S600). Para VCH₄, B300, B600, S300 e S400 mg/L, diferiram (P<0,05) de Br. Nenhum tratamento teve influência na DIVMS. A relação VCH₄/DIVMS aumentou (P<0,05) em 33,8% para S300. A concentração de NH₃ aumentou (P<0,05) para S400 e S600.

B100 e S300 mg/L reduziram ($P<0,05$) a concentração de ácido acético, porém S400 aumentou ($P<0,05$) em 21% a concentração desse ácido. Os tratamentos de ambos os extratos não diferiram estatisticamente de TC para o ácido propiônico. Os tratamentos reduziram ($P<0,05$) a concentração de ácido butírico entre 37,6 e 76,4%. A SAGV também reduziu ($P<0,05$) para todos os tratamentos, a exceção do tratamento S400. Os tratamentos com extrato de barbatimão provocaram queda na produção de CH₄, porém reduziu a SAGV, o que mostra que tal extrato nas doses avaliadas não é recomendado para melhorar a eficiência de uso da dieta por bovinos. Nas doses avaliadas, os tratamentos com extrato de sucupira apresentaram variação nos resultados dos parâmetros avaliados. Mais estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos desse extrato sobre os parâmetros de fermentação ruminal.

Palavras-chave: metabólitos secundários de plantas, produção de gás *in vitro*, taninos

ABSTRACT

EFFECT OF PLANT EXTRACTS, BARBATIMÃO AND SUCUPIRA, ON RUMINAL PARAMETERS FERMENTATION

GRADUATE STUDENT: Camila Eufrazio de Souza¹

TUTOR: Prof. Dr.Sergio Lúcio Salomon Cabral Filho¹

¹ Universidade de Brasília

The objective of this study was to evaluate the effect of plant extracts from Cerrado, barbatimão and sucupira, on volume of methane (VCH₄), in vitro dry matter degradability of (IVDMD), volume of methane per gram of degraded dry matter (VCH₄/IVDMD), ammonia (N-NH₃) and volatile fatty acids (VFA) concentrations. The incubation medium was prepared following the recommendations of Theodorou et al. (1994). In vitro gas production was performed by the use of a simple apparatus for measuring gas production through communicating vessels and methane concentration was determined by gas chromatography. IVDMD were determined at 24 h. Samples of *Brachiaria brizantha* were weighed into Ankom[®] filter bags (F57) and were used as the control treatment (Br). The tested doses were 100, 200, 300, 400 and 600 mg/L of solution for barbatimão (B100, B200, B300, B400 and B600) and sucupira (S100, S200, S300, S400 and S600). Treatments B300, B600, S300 and S400 mg/L differed (P<0.05) from Br to VCH₄. IVDMD was not affected. The VCH₄/DIVMS ratio increased (P<0.05) in 33.8% for S300. The N-NH₃ concentration increased (P<0.05) to S400 and S600. S300 and B100 reduced (P<0.05) acetic concentration, however S400 increased (P<0.05) in 21% the concentration of this acid. The treatments did not differ statistically from Br to propionic acid. The treatments reduced (P<0.05) butyric acid concentration from 37.6 to 76.4%. The sum of VFA also reduced (P<0.05) for both barbatimão and sucupira treatments, except to S400 treatment. Treatments with barbatimão

extract caused decreased in CH₄ production, but reduced SVFA, which shows that this extract in the doses evaluated, it is not recommended to improve the efficiency of use of the diet for cattle. Treatment with extract sucupira showed variation in the results of the parameters evaluated in this experiment. More studies should be conducted to elucidate the effects of this extract on ruminal fermentation.

Keyword: in vitro gas production, plant secondary metabolite, tannin

1. INTRODUÇÃO

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que plantas que contêm taninos em sua composição inibem o crescimento ou a atividade de micro-organismos ruminais produtores de metano, por ligarem-se à proteínas e enzimas presentes na parede celular (Pellikaan et al., 2011). De acordo com Schofield et al. (2001) isso ocorre devido aos múltiplos grupos fenólicos ligados às hidroxilas encontrados nos taninos, que permitem a eles a formação de complexos com proteínas e com polissacarídeos (celulose, hemicelulose, pectina). Entretanto, a redução na produção desse gás depende do tipo de tanino, se condensado ou hidrolisado, sendo a redução da digestão da fibra associado ao primeiro e a inibição de micro-organismos produtores de metano associado ao segundo tipo (Bodas et al., 2012).

De acordo com Taiz & Zeiger (2006), a formação de desse complexo pode provocar impacto negativo na dieta dos herbívoros uma vez que ele é difícil de digerir. No aparelho digestivo desses animais, as enzimas presentes na folhagem dos vegetais oxidam os fenóis às suas formas quinônicas correspondentes, sendo estas altamente reativas e ligando-se aos grupos nucleofílicos (-NH₂ e -SH₂) das proteínas (Taiz & Zeiger, 2006). Porém, também é relatado na literatura que a proteína que fica protegida da hidrólise microbiana e da deaminação no rúmen, pode ser disponibilizada para a digestão e absorção pós-rumen (Nozella, 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito de cinco doses de dois extratos de plantas do Cerrado, barbatimão e sucupira, em uma dieta composta por *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, na produção do metano ruminal, ácidos graxos voláteis, nitrogênio amoniacal e degradabilidade do alimento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Metabólitos secundários

Foram avaliados os extratos de duas plantas típicas do Cerrado, barbatimão (B) e sucupira (S). Para cada espécie as doses avaliadas foram 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L de solução. O tratamento controle (TC) foi a forragem *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. Os tratamentos, associados às respectivas doses citadas, foram denominados da seguinte maneira: B100, B200, B300, B400 e B600, para os tratamentos com extratos de barbatimão; e S100, S200, S300, S400 e S600 para os tratamentos com extrato de sucupira. Os extratos foram obtidos pela Universidade Federal de Goiás (UFG).

2.2. Substratos e análise bromatológica

Na Tabela 1 encontram-se os resultados para análise bromatológica para a forrageira e o concentrado. Os teores de matéria seca e cinzas foram determinados pela metodologia descrito por Silva (2006); os teores de fibra detergente neutro e fibra detergente ácido foram determinados pelo método Van Soest adaptado pela Ankom (2006); a digestibilidade *in vitro* da matéria seca para a forrageira foi determinada pelo método Ankom[®] (2005); e o teor de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl.

Tabela 1 – Composição química da forragem

Composição química (%)	Forragem
Matéria seca	91,65
Cinzas	11,01
Fibra detergente neutro	65,33
Fibra detergente ácido	37,11
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca	-
Proteína bruta	12,56

2.3. Preparo do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Química Analítica de Plantas (LQAP) da Embrapa Cerrados, localizada na BR 020 km 18, em Planaltina/DF. O substrato usado foi *Brachiaria brizantha*, pesado em saco F57 da Ankom®. No saco F57 pesou-se 0,5000 g de forragem.

O meio de cultura foi preparado seguindo-se as recomendações de Theodorou et al. (1994). Após a mistura dos reagentes, a solução foi mantida sob fluxo de gás carbônico (CO₂) por 1 hora, para conferir anaerobiose ao meio. O pH foi aferido e apontou aproximadamente 6,9 para os três experimentos realizados. O meio de cultura foi mantido a 39 °C até o momento da inoculação.

Dois bovinos fistulados foram doadores de líquido ruminal. Dois doadores eram animais cruzados e foram mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha* na Fazenda Água Limpa (FAL), área pertencente à Universidade de Brasília, Brasília/DF e recebiam silagem para complementar a dieta a pasto.

Após a coleta manual do líquido ruminal dos animais da FAL, este foi filtrado por quatro camadas de gaze, armazenado em garrafa térmica e levado ao LAQP. No laboratório, o líquido ruminal foi filtrado por uma camada de gaze e posteriormente adicionado ao meio de cultura. Após a mistura, a solução final foi mantida em banho maria à 39 °C e procedeu-se a inoculação, sendo todo o processo descrito acima gaseificado com CO₂.

2.4. Inoculação *in vitro*

A inoculação *in vitro* foi realizada em frasco âmbar de 100 mL contendo 36,4 mL de meio de cultura (solução), 13,6 mL de inóculo (líquido ruminal), 0,5000 g de

forragem, e os extratos que foram adicionados aos frascos um dia antes da inoculação. Cada frasco foi gaseificado com CO₂, fechado com tampa de silicone e mantido em estufa à temperatura de 39 °C. Cada um dos tratamentos possuía amostras triplicadas.

2.5. Mensuração e coleta de amostra da produção de gases

A mensuração dos gases produzidos foi realizada às 6 e às 24 horas após o início dos experimentos, pelo deslocamento de água medido pelo aparato de vasos comunicantes descrita por Fedorak & Hrudey (1983). As bandejas contendo os frascos âmbar permaneceram durante todo o tempo parcialmente imersas em banho maria à 39 °C. Para cada hora de mensuração, após o volume de água descolocado ser anotado, foi coletada uma alíquota dos gases por meio de uma seringa; os gases eram injetados em *exetainers* à vácuo.

Os gases fermentados foram analisados por cromatografia gasosa pelo equipamento Thermo modelo Trace GC Ultra. As características do detector foram: temperatura do bloco e do filamento de 180 e 240 °C, respectivamente, com o hélio usado como gás de arraste à pressão constante de 180 kPa e à 20 mL/min. As características da coluna foram: coluna empacotada com Porapak Q, I.D 2,0 mm x 2m. O injetor utilizado foi um *loop* de 0,5 MI no sistema de válvulas *backflush*. A temperatura do forno foi 85 °C e constante.

2.6. Determinação da degradabilidade *in vitro* da matéria seca

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi determinada 24 horas após o início do experimento. Depois de retirados dos frascos âmbar, os sacos F57 da Ankom® secaram a temperatura ambiente durante dois dias e depois foram colocados em estufa a 105°C por 3 horas e posteriormente pesados em balança analítica.

2.7. Coleta de amostra e determinação dos ácidos graxos voláteis

A coleta dos ácidos graxos voláteis procedeu-se 24 horas após iniciado o experimento. Uma alíquota de 10 mL da solução era armazenada em frasco contendo 2 mL de solução de ácido metafosfórico 20% concentrada. As amostras foram enviadas à Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, MG e foram analisadas por cromatografia.

Características do equipamento: Waters alliance e2695 com Detector PAD 2998 (*photodiode array detector*), sistema de separação constituído de coluna de fase reversa C18 ODS 80A (150 x 4,6 mm x 5 µm). As condições de análise foram: fase móvel com mistura isocrática constituída de 90% de solução aquosa ácida de ácido fosfórico pH 2,35-2,55 e 10% de metanol, temperatura do forno de 25 ± 5 °C, volume de injeção de amostra de 20 microlitros, corrida com 12 minutos e detector com comprimento de onda de excitação em 210 nm. A quantificação foi obtida por curva de calibração com uso de padrões externos.

2.8. Coleta de amostra e determinação do nitrogênio amoniacal

A coleta de amostras para determinação do nitrogênio amoniacal também foi realizada às 24 horas. Uma alíquota de 10 mL da solução fermentada foi armazenada em um frasco contendo 1mL de ácido sulfúrico na concentração de 50%. As amostras foram avaliadas no Laboratório de Análise de Alimentos da UnB, seguindo o método da destilação de Kjeldahl descrito por Detmaan et al. (2012).

2.9. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente ao acaso. Os dados para volume de metano, volume de metano por matéria seca degradada *in vitro*, degradabilidade *in vitro* da matéria seca, ácidos graxos voláteis, e nitrogênio amoniacal foram submetidos à análise de variância utilizando o GLM Procedure do programa estatístico SAS (2001). Os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.1 encontram-se os resultados para VCH₄, DIVMS e VCH₄/DIVMS. Para os tratamentos com extrato de barbatimão, somente B400 reduziu (P<0,05) VCH₄ em relação ao tratamento controle (TC). Para DIVMS e VCH₄/DIVMS não houve diferença estatística em relação à TC. Os dados obtidos para a DIVMS da *Brachiaria brizantha* estão de acordo com os encontrados por Sousa et al. (2011) em estudo sobre a cinética de fermentação ruminal *in vitro* da *B. brizantha* cv. Marandu, no qual os valores variaram entre 63 e 68%, de acordo com a época do corte.

Os tratamentos com sucupira variaram entre si e em relação à TC para VCH₄ e VCH₄/DIVMS. S100 e S200 não diferiram (P>0,05) de TC ou entre si para VCH₄, contudo, S300, S400 e S600 diferiram (P<0,05) de TC, aumentando VCH₄.

Estudos mostram que a emissão de CH₄ por ruminantes pode ser reduzida com o fornecimento de forragens que contêm tanino, porém geralmente é acompanhada de redução na degradabilidade da forragem (Beauchemin et al., 2007, Hariadi & Santoso, 2009, Bhatta et al., 2012). De acordo com McAllister et al. (1994), os taninos condensados podem formar o complexo tanino-proteína com as enzimas microbianas e, conseqüentemente, inibir a digestão da fibra pelas bactérias celulolíticas. Tan et al. (2011) avaliaram o efeito *in vitro* de 10, 15, 20, 25 e 30 mg de taninos condensados (TC) puros extraídos de *Leucaena leucocephala* e observaram decréscimo entre 33 e 63% no VCH₄/DIVMS à medida que a concentração de TC aumentou, porém para a DIVMS houve declínio significativo somente para as maiores doses 20 – 30 mg (22 - 37%). Nesse experimento, os tratamentos B100, B200, B300 e B600 reduziram VCH₄ sem influenciar na DIVMS e reduziram (P<0,05) a relação VCH₄/DIVMS, indicando eficiência de uso da dieta.

Jayanegara et al. (2009) avaliaram diferentes espécies de plantas coletadas na Mongólia, que contêm tanino em sua composição, e relataram que diferentes proporções de

taninos totais (TT), taninos condensados (TC) e fenóis totais (FT) apresentaram diferentes atividades na concentração de CH₄. No trabalho desses autores, foi observado que as espécies com FT contribuíram mais com a redução na produção desse gás do que os TT, sugerindo que os fenóis não-tanino têm relação com a atividade de concentração de metano; já os TC tiveram fraca correlação com a redução de CH₄. Os óleos de sucupira e barbatimão podem possuir em sua composição diferentes concentrações de TT, FT, TC e taninos hidrolisados (TH) (Pellikaan et al., 2011, Hassanat & Benchaar, 2012) e isso pode ter resultado nos diferentes efeitos na supressão de CH₄ no rúmen encontrados nesse trabalho.

Tabela 3.1 - Volume de metano (VCH₄), degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada (VCH₄/DIVMS) e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e diferenças em relação ao tratamento controle (TC)

Trat.*	VCH ₄ (mL)		DIVMS (%)		VCH ₄ /DIVMS (mL/g)		N-NH ₃ (mg/L)	
		≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)		≠ (%)
TC	1,56 ^{cd}	-	57,69 ^{ab}	-	12,48 ^{cd}	-	2,80 ^{bcd}	-
B100	1,25 ^{ef}	-19,81	58,19 ^{ab}	0,87	9,92 ^e	-20,51	2,91 ^b	4,15
B200	1,24 ^f	-20,58	58,13 ^{ab}	0,76	9,84 ^e	-21,15	2,68 ^{bcd}	-4,18
B300	1,14 ^f	-26,82	55,71 ^b	-3,43	9,46 ^e	-24,20	2,48 ^{cd}	-11,48
B400	1,37 ^{def}	-12,15	57,06 ^{ab}	-1,09	11,09 ^{cde}	-11,14	2,83 ^{bc}	1,04
B600	1,22 ^f	-21,35	55,95 ^b	-3,02	10,12 ^{de}	-18,91	2,39 ^d	-14,59
S100	1,62 ^{cd}	3,99	56,57 ^b	-1,94	13,22 ^{bc}	5,93	2,97 ^b	6,22
S200	1,50 ^{cde}	-3,54	59,16 ^{ab}	2,55	11,76 ^{cde}	-5,77	2,77 ^{bcd}	-1,07
S300	2,13 ^a	36,85	59,24 ^{ab}	2,69	16,65 ^a	33,41	2,88 ^{bc}	3,11
S400	1,98 ^{ab}	27,01	58,87 ^{ab}	2,05	15,52 ^{ab}	24,36	3,67 ^a	31,21
S600	1,73 ^{bc}	11,13	63,37 ^a	9,85	12,61 ^c	1,04	3,41 ^a	21,84
CV (%)	5,88		3,73		7,04		5,08	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo teste de Tukey.

*Tratamento controle (TC): *Brachiaria brizantha* cv. Marandu; extratos de barbatimão (B) e sucupira (S) nas doses de 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L.

A concentração de N-NH₃ (Tabela 3.1) diferiu (P<0,05) para S400 e S600, que apresentaram aumento de 31 e 22%, respectivamente. Os demais tratamentos com barbatimão e sucupira não diferiram (P>0,05) de TC. De acordo com Min et al. (2003) e Williams et al. (2011) os taninos condensados reduzem a degradação da proteína no ambiente ruminal por

reações entre os grupos hidroxila dos taninos com as proteínas. Entretanto, essa ligação leva à redução da degradação da proteína e, como consequência, menor produção de nitrogênio amoniacal e maior fluxo de nitrogênio não amoniacal para o duodeno (Frutos et al., 2004).

Hariadi & Santoso (2009) também não observaram diferença na concentração de N-NH₃ ao trabalharem com espécies tropicais, como *Acacia mangium*, *Pennisetum purpureum* e *Phaleria papuana*. Somente uma espécie (*Sesbania grandiflora*) aumentou a concentração de N-NH₃, o que de acordo com os autores foi consequência da maior concentração de proteína bruta que essa espécie apresentou. Segundo os autores, a concentração de amônia para todas as espécies manteve-se acima dos valores máximos tanto para o crescimento microbiano quanto para a digestão da fibra. Já Macheboeuf et al. (2008) relataram que doses muito altas de O.E de cinamaldeído e timol aumentaram a concentração de N-NH₃ devido à provável lise das bactérias produtoras de amônia.

Os resultados para o ácido acético mostram que S300 e S400 diferiram (P<0,05) de TC. O primeiro reduziu em 24,5% a produção desse ácido e o último aumentou em 21% a concentração. Para o ácido propiônico os tratamentos não diferiram (P>0,05) de TC ou entre si. Todos os tratamentos diferiram (P<0,05) de TC para o ácido butírico, reduzindo sua concentração entre 37,5 e 76%. Somente S400 foi estatisticamente igual à TC para SAGV, com todos os demais tratamentos reduzindo entre 18 e 32,8% a SAGV. Tan et al. (2011) também observaram redução na SAGV em todos os níveis de inclusão de TC, comparados ao tratamento sem adição de tanino, porém houve aumento numérico na produção de ácido acético, o que no presente experimento ocorreu para S100 e S400. No trabalho de Tan et al. (2011) houve redução no ácido propiônico e pouquíssima variação na concentração de ácido butírico. No presente trabalho, a redução na SAGV ocorreu principalmente devido à redução significativa de ácido butírico, que foi entre 42,32 e 86,04%.

Os tratamentos com extrato de barbatimão que apresentaram redução (P<0,05) de VCH₄ não influenciaram na DIVMS, nas concentrações de N-NH₃, ácido acético, propiônico, mas reduziram significativamente (P<0,05) a concentração de ácido butírico e SAGV. Bodas et al. (2012) citam que quando há concentração de TH nas plantas, a redução na produção de CH₄ ocorre devido à inibição de micro-organismos produtores desse gás. Hassanat & Benchaar (2012) relataram que a redução na concentração total de AGV pode estar relacionada à formação do complexo tanino-carboidrato ou tanino-proteína, que são menos degradados, ou a toxicidade ao micro-organismos ruminais, ou ambos.

Os tratamentos com extrato de sucupira que apresentaram aumento (P<0,05) de VCH₄ não influenciaram na DIVMS, todavia, para os demais efeitos nos parâmetros de

fermentação ruminal, esses tratamentos apresentaram resultados diferentes. S300 aumentou a relação VCH₄/DIVMS (33,8%), não alterou N-NH₃, reduziu ácido acético (24,6%) e o ácido butírico (71,23%) e SAGV (32,8%). S400 aumentou a relação VCH₄/DIVMS (24,7%), aumentou N-NH₃ (31,21%) e ácido acético (21%), reduziu ácido butírico (56%) e não diferiu estatisticamente de TC para SAGV.

Tabela 3.2 – Concentração (μmol/mL) dos ácidos acético, propiônico e butírico e soma dos ácidos (SAGV), e seus respectivos coeficientes de variação (CV) e diferenças em relação ao tratamento controle (TC)

Trat.	Acético		Propiônico		Butírico		SAGV	
	μmol/mL	≠ (%)	μmol/mL	≠ (%)	μmol/mL	≠ (%)	μmol/mL	≠ (%)
TC	14,07 ^b	-	4,28 ^{ab}	-	9,31 ^a	-	36,72 ^a	-
B100	10,54 ^{cd}	-25,09	3,49 ^b	-18,46	5,37 ^b	-42,32	28,46 ^{bc}	-22,49
B200	14,08 ^b	0,07	3,56 ^b	-16,82	1,88 ^d	-79,81	28,57 ^{bc}	-22,20
B300	14,01 ^b	-0,43	4,07 ^b	-4,91	1,86 ^d	-80,02	28,99 ^{bc}	-21,02
B400	13,29 ^{bc}	-5,54	4,17 ^{ab}	-2,57	1,30 ^d	-86,04	27,83 ^{bc}	-24,22
B600	13,02 ^{bc}	-7,46	4,88 ^a	14,02	1,81 ^d	-80,56	28,76 ^{bc}	-21,68
S100	15,26 ^{ab}	8,46	3,56 ^a	-16,82	2,17 ^d	-76,69	30,04 ^b	-18,19
S200	12,61 ^{bcd}	-10,38	4,26 ^{ab}	-0,47	1,78 ^d	-80,88	27,72 ^{bc}	-24,51
S300	9,49 ^d	-32,55	4,28 ^{ab}	0,00	1,85 ^d	-80,13	24,68 ^c	-32,79
S400	19,98 ^a	42,00	4,42 ^{ab}	3,27	3,44 ^c	-63,05	34,89 ^a	-4,96
S600	12,37 ^{bcd}	-12,08	4,34 ^{ab}	1,40	2,02 ^d	-78,30	27,79 ^{bc}	-24,33
CV (%)	8,13		10,57		12,71		4,94	

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem (P<0,05) entre si pelo teste de Tukey.

*Tratamento controle (TC): *Brachiaria brizantha* cv. Marandu; extratos de barbatimão (B) e sucupira (S) nas doses de 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L.

Hassanat & Benchaar (2012) afirmam que a redução de metano pelos taninos está relacionada à toxicidade à metanogênicas ou declínio na produção de H₂ devido à redução de acetato e butirato, consequência da redução na degradação da fibra. No presente experimento, para S400, ocorreu o contrário. Esse tratamento aumentou a concentração de acetato e metano, sem influenciar a DIVMS. O aumento na concentração de ácido acético indica que os micro-organismos que degradam a fibra não foram afetados, resultando em aumento na concentração no VCH₄. O aumento na concentração de N-NH₃ sugere que pode ter ocorrido lise das bactérias que produzem amônia (Macheboeuf et al., 2008) ou que os taninos presentes no extrato de sucupira não têm afinidade com proteínas (Hassanat &

Benchaar, 2012). Estudos mostram que os taninos têm maior afinidade por proteínas do que por carboidratos, e que isso pode explicar seus efeitos mais acentuados na concentração de N-NH₃ do que na produção de AGV, durante fermentações *in vitro* (Hassanat & Benchaar, 2012). Entretanto, pelos resultados apresentados por S400, pode ter ocorrido o oposto, ou seja, maior afinidade dos taninos com o carboidrato.

4. CONCLUSÕES

Os tratamentos com extrato de barbatimão provocaram queda na produção de CH₄, porém reduziram a SAGV, o que mostra que tal extrato, nas doses avaliadas, não é recomendado para melhorar a eficiência de uso da dieta por bovinos.

Os tratamentos com extrato de sucupira apresentaram variação nos resultados dos parâmetros avaliados nesse experimento. Mais estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos desse extrato sobre os parâmetros de fermentação ruminal.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; MARTINEZ, T.F. et al. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 1990-1996, 2007.

BHATTA, R.; SARAVANAN, M.; BARUAH, L. et al. Nutrient content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2929-2935, 2012.

BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 78– 93, 2012.

DETMANN, E. **Métodos para análise de alimentos**. 1. ed. Visconde de Rio Branco, MG: Suprema, 2002. 214p.

FEDORAK, P.M.; HRUDEY, S. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. **Environmental Technology Letters**, v. 4, p. 425-432, 1983.

HARIADI, B.T.; SANTOSO, B. Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 456-461, 2010.

HARIADI, B.T.; SANTOSO, B. Evaluation of tropical plants containing tannin on *in vitro* methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 456-461, 2010.

HASSANAT, F.; BENCHAAAR, C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 332-339, 2013.

JAYANEGARA, A.; TOGTOKHBAYAR, N.; MAKKAR, H.P.S. et al. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, p. 230-237, 2009.

MACHEBOEUF, D.; MORGAI, D.P.; PAPO, Y. et al. Dose–response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p. 335-350, 2008.

MCALLISTER, T.A.; BAE, H.D.; JONES, G.A. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 3004-3018, 1994.

MIN, B.R.; BARRY, T.N.; ATTWOOD, G.T. et al. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 106, p. 3-19, 2003.

NOZELLA, E.F. **Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**. 2006. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PELLIKAAN, W.F.; STRINGANO, E.; LEENAARS, J. et al. Evaluating effects of tannins on extent and rate of *in vitro* gas and CH₄ production using an automated pressure evaluation system (APES). **Animal Feed Science and Technology**, v. 166–167, p. 377– 390, 2011.

SAS – Statistic Analyses System. **Institute Inc. Statistical Analysis System Introductory Guide for Personal Computers**. Release. Cary, (NC: SAS Institute Inc.), 2001.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 235p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TAN, H.Y.; SIEO, C.C.; ABDULLAH, N. et al. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 169, p. 185-193, 2011.

THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A., DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, v. 18, n. 2, p. 104-111, 1963.

VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.9, p.3583 - 3597, 1991.

WILLIAMS, C.M.; EUN, J.-S.; MACADAM, J.W. et al. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p. 364-372, 2011.