



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

**TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE GÁS COMO PREDITORAS DO VALOR
NUTRICIONAL DE DIETAS E EXTRATO DE *Poincianella pyramidalis* Tul. COMO
MODULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL**

JURACI MARCOS ALVES SUASSUNA

**AREIA
2020**

JURACI MARCOS ALVES SUASSUNA

**TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE GÁS COMO PREDITORAS DO
VALOR NUTRICIONAL DE DIETAS E EXTRATO DE *Poincianella
pyramidalis* Tul. COMO MODULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL**

Tese apresentada ao programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. Alberício Pereira de Andrade

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Yanna Carolina Ferreira Teles

**AREIA
2020**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S939t Suassuna, Juraci Marcos Alves.

Técnicas de produção de gás como preditoras do valor nutricional de dietas e extrato de *Poincianella pyramidalis* Tul. como modulador da fermentação ruminal / Juraci Marcos Alves Suassuna. - Areia, 2020.
108 f. : il.

Orientador: Ariosvaldo Nunes de Medeiros.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Amônia. 2. Cinética de fermentação. 3. Degradabilidade. 4. Extratos de plantas. 5. *Poincianella pyramidalis* (Tul.). I. Medeiros, Ariosvaldo Nunes de. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE DOUTORADO INTEGRADO EM ZOOTECNIA**

PARECER DE DEFESA DO TRABALHO DE TESE

TÍTULO: “Técnicas de produção de gás como preditoras do valor nutricional de dietas e extrato de *Poincianella pyramidalis* Tul. como modulador da fermentação ruminal”

AUTOR: Juraci Marcos Alves Suassuna

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros
Presidente
Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dra. Juliana Silva de Oliveira
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba

Dra. Beatriz Dantas de Oliveira Fernandes
Examinadora
Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dra. Patrícia Mendes Guimarães Beelen
Examinadora
Universidade Federal de Alagoas

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Alves Rufino
Examinador
Universidade Federal da Paraíba

Areia, 28 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JURACI MARCOS ALVES SUASSUNA, filho de Juraci Suassuna e Odeci Alves Pereira, nasceu no dia 04 de maio de 1986, na cidade de Catolé do Rocha - PB. Em 2006 concluiu o Curso Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Codó - MA. Em 2007 ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Federal da Paraíba, concluindo-o no ano de 2011. Foi bolsista de iniciação científica PIVIC/CNPq durante o período de 2008 a 2009 e bolsista PIBIC/CNPq de 2009 a 2011 sob orientação do Prof. Paulo Sérgio de Azevedo. Em abril de 2012 ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, com dissertação intitulada “Espirulina (*Spirulina platensis*) na alimentação de ovinos em confinamento”, sob orientação do Professor Dr. Marcelo de Andrade Ferreira. Em 2015, ingressou no programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, subprograma da Universidade Federal da Paraíba em Areia-PB, sob orientação do Professor Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros.

*À minha esposa **Laís Leite Barreto** por todo amor e companheirismo e a nossa menina,
Flora Barreto Suassuna, presente de Deus em nossas vidas.*
*À meu pai **Juraci Suassuna** e minha mãe **Odeci Alves Pereira** pelo amor incondicional e por
estarem sempre torcendo pelo meu sucesso.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por estar presente em minha vida e na vida de minha família.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao meu comitê de orientação, composto pelo professor Ariosvaldo Nunes de Medeiros (orientador), que mais do que um orientador, é um amigo, muitas vezes um pai, a quem tenho grande respeito e admiração. Obrigado pela orientação durante o doutorado, sempre com palavras de sabedoria e incentivo, e pela confiança que sempre teve em mim; aos meus coorientadores, Prof. Alberício Pereira de Andrade e Profa. Yanna Carolina Ferreira Teles, pelas contribuições dadas ao trabalho.

À minha banca examinadora composta pelos professores, Dra. Patrícia Beelen – UFAL, Dra. Juliana Oliveira – UFPB, Dr. Marcelo Rufino e Dra. Beatriz Dantas - UFPB. Agradeço imensamente pelas contribuições dadas ao trabalho.

Ao professor Dr. Daniel R. Menezes – UNIVASF, pelas contribuições durante a defesa de qualificação e doutorado, e por ter sempre atendido minhas consultas quando necessitei tirar dúvidas a respeito do projeto.

Ao professor Dr. André Magalhães - UFRPE, por ter cedido os frascos de incubação do sistema semiautomático, para que pudéssemos realizar os testes de produção de gás e pelas contribuições durante a defesa de qualificação.

À professora Dra. Stela A. Urbano – UFRN, por ter cedido os animais fistulados e por estar sempre disposta a contribuir quando solicitada.

Ao Dr. Lucas Kennedy pela grande contribuição dada ao trabalho, tendo sido bastante criterioso e cuidadoso na correção de parte do trabalho e por ter se mostrado prontamente disponível sempre que o consultei para tirar dúvidas.

Aos meus ex-companheiros de trabalho, Seu Costa (*In memorian*) e Duelo, e ao atual companheiro de batalha, Jota Sales, amigos queridos, que desde o início do doutorado, compreenderam a situação, entenderam minhas ausências e não hesitaram em dá todo o apoio necessário.

A toda galera do “Nutriaridus”, Anaiane, Felipe, Francinilda, Marina, Alice, Luana, Natália, Joederson, Angélica, Gabrielle, Alidiel, José Eduardo, Júlio, pessoas que além de se tornarem grandes amigos, tornando a hora do cafezinho um momento de descontração e resenha, ajudaram-me muito durante a realização do experimento.

À Cintia Mirely, companheira de batalha, e que contribuiu imensamente com o trabalho, que compartilhou os momentos de descobertas e de angústias (kkkkkkk) durante toda a implantação e execução do experimento.

E por último, de forma muito especial, à minha esposa Laís, por estar sempre ao meu lado me apoiando, por ter compreendido os meus momentos de ausências e por, muitas vezes, ter deixado suas prioridades de lado para que eu pudesse estar aqui nesse momento; e também quero agradecer à nossa pequena Flora, nosso maior presente, que mesmo sem entender, me fazia esquecer os momentos de cansaço. Amo vocês.

A toda minha família, em especial, meu pai Juraci Suassuna e minha mãe Odecí, e às minhas irmãs Juranice e Joelma. Amo vocês.

Enfim, a todas as pessoas que, traídos pela memória, foram esquecidas e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Minha eterna gratidão.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos. Muito Obrigado!

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
Capítulo 1 Revisão de Literatura.....	19
1 TÉCNICAS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS	20
1.1 INTRODUÇÃO.....	20
1.2 TÉCNICAS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS E DIETAS PARA RUMINANTES	21
1.2.1 Técnicas de digestibilidade.....	21
1.2.2 Técnicas de produção de gás para avaliação de alimentos	23
1.2.2.1 Técnicas semiautomáticas de produção de gás.....	24
1.2.2.2 Técnicas automáticas de produção de gás	26
2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS (MSPs) COMO MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	28
2.1 INTRODUÇÃO.....	28
2.2 DESCRIÇÃO GERAL DOS MSPs.....	28
2.3 EFEITOS GERAIS DOS MSPs SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	31
2.4 EFEITO DOS MSPs SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO (CH ₄)	35
2.4.1 Efeito dos taninos sobre a produção de CH ₄	36
2.4.2 Efeito das saponinas sobre a produção de CH ₄	37
2.4.3 Efeito dos óleos essenciais sobre a produção de CH ₄	39
REFERÊNCIAS	41
 Capítulo 2. Técnicas de produção de gás <i>in vitro</i> como preditoras do valor nutricional de dietas para ruminantes.....	 52
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 DIETAS EXPERIMENTAIS	57
2.2 TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE GÁS	57
2.3 DEGRADAÇÃO E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS <i>IN VITRO</i>	58
2.3.1 Animais doadores	58
2.3.2 Preparação do inóculo microbiano	58

2.3.3	Preparo do meio de incubação	59
2.3.4	Preparo dos frascos de incubação	59
2.3.5	Cinética de produção de gás e degradabilidade dos nutrientes	60
2.4	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	61
2.5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
3	RESULTADOS	63
4	DISCUSSÃO	89
5	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

Capítulo 3. Cinética de produção de gás e degradabilidade *in vitro* de dietas contendo extrato vegetal da Catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul. L. P. Queiroz)..... 77

1	INTRODUÇÃO	80
2	MATERIAL E MÉTODOS	82
2.1	COLHEITA DAS PLANTAS	82
2.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO	82
2.3	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS	83
2.3.1	Polifenóis totais	83
2.3.2	Taninos totais.....	83
2.3.3	Flavonoides totais	84
2.4	DIETAS EXPERIMENTAIS	84
2.5	DEGRADAÇÃO E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS <i>IN VITRO</i>	85
2.5.1	Animais doadores	85
2.5.2	Preparação do inóculo microbiano	85
2.5.3	Preparo do meio de incubação	85
2.5.4	Níveis testados e diluição do extrato	85
2.5.5	Preparo dos frascos de incubação	86
2.5.6	Cinética de produção de gás e degradabilidade dos nutrientes	87
2.6	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL	88
2.7	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	89
3	RESULTADOS	90
3.1	DEGRADABILIDADE DOS NUTRIENTES	90

3.2	PARÂMETROS RUMINAIS (pH, N-NH ₃ e AGCC).....	92
3.3	PRODUÇÃO DE GÁS <i>IN VITRO</i>	95
4	DISCUSSÃO	97
5	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	103
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES	108

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 - Composição química dos ingredientes e das rações experimentais	57
Tabela 2 - Composição das soluções usadas para preparar o meio de incubação, conforme descrito por Theodorou et al. (1994)	59
Tabela 3 - Estimativa dos parâmetros de produção de gás <i>in vitro</i> de duas dietas em função de duas técnicas de produção de gás, após 72 horas de incubação e interação “dieta × técnica” para a produção total de gás (<i>V_t</i>).	63
Tabela 4 - Parâmetros ruminais e degradabilidade dos nutrientes às 48 horas de incubação em função de duas técnicas de produção de gás e duas dietas e interação “dieta × técnica” para a degradabilidade da proteína bruta (DPB)	67

Capítulo 3

Tabela 1 -Screening fitoquímico do extrato etanólico e quantificação dos compostos secundários de <i>Poincianella pyramidalis</i> (Tul.) L. P. Queiroz	83
Tabela 2 - Composição química dos ingredientes e das rações experimentais	84
Tabela 3 - Composição das soluções usadas para preparar o meio de incubação, conforme descrito por Theodorou et al. (1994)	86
Tabela 4 - Degradabilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e da fibra em detergente neutro em função dos níveis de extrato de <i>P. pyramidalis</i> e das dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.....	90
Tabela 5 - Parâmetros ruminais <i>in vitro</i> em função dos níveis de extrato de <i>P. pyramidalis</i> e das dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.....	93
Tabela 6 - Estimativa dos parâmetros de produção de gás <i>in vitro</i> em função dos níveis de extrato de <i>P. pyramidalis</i> e de dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.....	96

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1 - Ilustração de um módulo de produção de gás sem fio *in vitro*. O módulo de produção de gás (a) mede a pressão da fermentação no jarro continuamente e libera gás em um determinado ponto de ajuste acima da pressão atmosférica. Os dados são transferidos sem fio de todos os módulos, que podem ser incubados em banho-maria ou em uma incubadora (b) (Fonte: STORM et al., 2012)..... 27

Capítulo 2

Figura 1 - (A) Sistema semiautomático de produção de gás; (B) Sistema automático de produção de gás..... 58

Figura 2 - (A) Frascos de incubação mantidos sob refrigeração após serem selados com a tampa; (B) Frascos transferidos para estufa de produção de gás antes da adição do líquido ruminal . 60

Figura 3 - Perfis de produção gás oriundos da fermentação dos carboidratos não fibrosos - CNF (A), fibrosos - CF (B), e totais – CT (C), após 48 horas de incubação; diagramas de dispersão para avaliar a correlação entre a técnica automática e semiautomática, para os CNF (D), CF (E) e CT (F); produção média de gás oriundo da fermentação dos CNF (G), CF (H) e CT (I), a partir da técnica automática e semiautomática; r = correlação entre as duas técnicas; P = significativo a 5% de probabilidade. 65

Figura 4 - Interação “dieta $\times$ tempo” para a produção média de gás dos carboidratos não fibrosos (A) ($P < 0,0001$) e carboidratos totais (B) ($P < 0,0001$) 66

Figura 5 - Análise de componentes principais e dendrograma para estimativa dos parâmetros de produção de gás *in vitro*, parâmetros ruminais e degradabilidade dos nutrientes de duas dietas em função de duas técnicas de produção de gás. A: correlação em círculo para 12 características e dispersão dos tratamentos em função dos dois primeiros componentes, as setas representam a direção da característica e as cores de gradiente representam a contribuição de cada característica para os componentes. Do azul ao vermelho: contribuições baixas a altas; B: dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA com base na distância de Gower; Dieta 1 = baixo CNF e Dieta 2 = alto CNF 68

Capítulo 3

Figura 1 - (A) Frascos de incubação mantidos sob refrigeração (4 °C); (B) Caixas com frascos de incubação na estufa de produção de gás (39 °C).....	87
Figura 2 - Degradabilidade da fibra em detergente neutro às 48 horas ($P = 0,0403$) em função dos níveis de extrato de <i>P. pyramidalis</i> (0, 3, 6 e 9%)	91
Figura 3 - Interação “extrato × dieta” para a degradabilidade da proteína bruta às 24 horas (A) ($P = 0,0009$) e 48 horas (B) ($P = 0,0036$), e da fibra em detergente neutro às 24 horas (C) ($P = 0,0070$); dieta de baixo CNF (—●—) e dieta de alto CNF (--▲--).	92
Figura 4 - Valores médios do pH (A) ($P = 0,0001$) e do N-NH ₃ (mg/dL) (B) ($P = 0,0002$) em função dos níveis de extrato de <i>P. pyramidalis</i> (0, 3, 6 e 9%)	94
Figura 5 - Interação, “extrato × hora” (A) ($P = 0,0015$) e “dieta x hora” (B) ($<0,0001$) para a variável pH	95
Figura 6 - Produção cumulativa de gás em ml/g de MO (A) e produção média de gás (ml/g MO) (B) ($P = 0,0419$) em função dos níveis de extrato de <i>P. pyramidalis</i> (0, 3, 6 e 9%)	96

RESUMO GERAL

Este estudo envolveu dois experimentos. No primeiro, objetivou-se comparar os perfis de produção de gás e degradabilidade dos nutrientes de dietas utilizando duas técnicas de produção de gás *in vitro*, automática e semiautomática. Para isso, foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados em arranjo fatorial 2×2 , sendo duas dietas com diferentes proporções de carboidratos não fibrosos (CNF), (baixo CNF vs alto CNF) e duas técnicas de produção de gás (automática vs semiautomática), com quatro repetições, sendo os blocos representados por três ensaios diferentes. A produção de gás oriunda da fermentação dos carboidratos fibrosos (Vf_2) foi 22% maior na técnica automática em relação à semiautomática. Houve interação para a estimativa da produção total de gás (Vt) às 72 horas de incubação ($P = 0,034$), onde na técnica automática a produção foi maior em relação a técnica semiautomática, para dieta de alto e baixo CNF. A produção de gás oriunda dos CNF (Vf_1) apresentou correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,94$; $R^2 = 0,87$), enquanto para o Vf_2 foi observada correlação positiva forte ($r = 0,702$; $R^2 = 0,47$). Foi observada uma correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,96$; $R^2 = 0,93$) entre as técnicas, para a produção total de gás (Vt). Houve maior degradabilidade da matéria seca (MS) (+ 3,8%), matéria orgânica (MO) (+ 3,3%). Em ambas as dietas, a degradabilidade da proteína bruta (PB) foi maior na técnica semiautomática ($P < 0,0001$). A dieta de alto CNF resultou em menor pH e menor $N-NH_3$ no meio de incubação, comparado à de baixo CNF, enquanto a degradabilidade da MS, MO e PB aumentou. As técnicas de produção de gás automática e semiautomática, estimaram de modo semelhante os parâmetros cinéticos e os perfis de produção de gás total, demonstrando o potencial de ambas técnicas para avaliação do valor nutricional de dietas com diferentes proporções de CNF. No segundo estudo, objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de extrato vegetal de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz sobre a cinética de produção de gases e a degradabilidade de dietas com diferentes proporções de carboidratos não fibrosos (CNF). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4×2 , com quatro níveis de inclusão de extrato [0, 3, 6, 9% da matéria seca (MS)] e duas dietas (baixo CNF e alto CNF), e três repetições, sendo os blocos representados por dois ensaios. Na dieta de alto CNF, a degradabilidade da proteína bruta foi reduzida linearmente com o aumento dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* ($P < 0,05$). Houve efeito quadrático ($P = 0,0009$) do extrato de *P. pyramidalis* sobre a degradabilidade da fibra em detergente neutro, com ponto de máximo estimado em 609,7 g/kg de MS para o nível de 2,16%. O aumento dos níveis de extrato reduziu linearmente o pH ($P = 0,0001$), $N-NH_3$ ($P = 0,0002$), proporção molar de acetato ($P = 0,0363$) e da relação

acetato: propionato ($P = 0,0118$). A dieta com baixo CNF resultou em maior valor de pH, N-NH₃, ácidos graxos de cadeia curta e proporção molar de acetato comparado à dieta de alto CNF. A adição de extrato de *P. pyramidalis* aumentou de forma linear ($P = 0,0419$) a produção de gás média (ml/g MO). A dieta de alto CNF resultou em maior volume (ml/g MS) e maiores taxas de produção de gás ($P < 0,0001$) e maior *lag time* ($P = 0,0290$) comparado à dieta de baixo CNF. A inclusão de extrato de *P. pyramidalis* em ambas dietas avaliadas modificou o padrão de fermentação ruminal, favorecendo a produção de propionato e reduzindo o acetato. O efeito do extrato sobre a degradabilidade da proteína bruta foi mais acentuado na dieta com alto CNF, observando-se uma redução da degradabilidade de proteína bruta com o aumento dos níveis de *P. pyramidalis*. A degradabilidade da fibra em detergente neutro foi favorecida até o nível de 2,16% de extrato, a partir desse nível reduziu.

Palavras chave: Ácidos graxos de cadeia curta. Amônia. Cinética de fermentação. Degradabilidade. Extratos de plantas. *Poincianella pyramidalis* (Tul.)

GENERAL ABSTRACT

This study consisted of two experiments. In the first, the aim was to compare the gas production profiles and nutrient degradability of diets using two *in vitro* gas production techniques, automatic and semi-automatic. For this, a randomized block design in a 2×2 factorial arrangement was adopted, with two diets with different proportions of non-fibrous carbohydrates (NFC), (low NFC vs high NFC) and two gas production techniques (automatic vs semi-automatic), with four replicates. The blocks represented three *in vitro* runs. Gas production from the fermentation of fibrous carbohydrates (V_f2) was 22% higher in the automatic technique compared to the semiautomatic. There was interaction for the estimation of the total gas production (V_t) at 72 hours of incubation ($P = 0.034$), where in the automatic technique the production was higher than the semi-automatic technique, for high and low NFC diet. Gas production from NFC (V_f1) showed a positive correlation of high magnitude ($r = 0.94$; $R^2 = 0.87$), while for V_f2 a strong positive correlation was observed ($r = 0.702$; $R^2 = 0.47$). There was a positive correlation of high magnitude ($r = 0.96$; $R^2 = 0.93$) between the techniques, for the total gas production (V_t). There was greater degradability of dry matter (DM) (+ 3.8%), organic matter (OM) (+ 3.3%). In both diets, the degradability of crude protein (CP) was greater in the semiautomatic technique ($P < 0.0001$). The high NFC diet resulted in lower pH and lower N-NH₃ in the incubation medium, compared to the low NFC diet, while the degradability of DM, OM and CP increased. The automatic and semi-automatic techniques estimated the kinetic parameters and the profiles of total gas production similarly, demonstrating the potential of both techniques for assessing the nutritional value of diets with different proportions of NFC. In the second study, the aim of this study was to evaluate the effect of including *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz extract on gas production kinetics and the degradability of diets with different proportions of non-fibrous carbohydrates (NFC). A randomized block design in a 4×2 factorial arrangement was adopted, with four levels of extract inclusion [0, 3, 6, 9% of dry matter (DM)], two diets (low NFC and high NFC), and three replicates. The blocks represented two *in vitro* runs. In the high NFC diet, protein degradability was linearly reduced with increase of *P. pyramidalis* extract levels ($P < 0,05$). There was a quadratic effect ($P = 0.0009$) of *P. pyramidalis* extract on the fiber in neutral detergent degradability, with a maximum point estimated at 609.7 g/kg DM for the level of 2.16%. There was a linear reduction in pH ($P = 0.0001$), N-NH₃ ($P = 0.0002$), acetate molar proportion ($P = 0.0363$) and the acetate: propionate ratio ($P = 0.0118$) with increase of extract levels. The low NFC diet resulted in a higher pH value, N-NH₃, short chain fatty acids and molar proportion of acetate compared to

the high NFC diet. The addition of *P. pyramidalis* extract increased linearly ($P = 0.0419$) the average gas production (ml/g OM). The high NFC diet resulted in greater volume (ml/g DM) and higher gas production rates ($P < 0.0001$) and greater lag time ($P = 0.0290$) compared to the low NFC diet. The inclusion of *P. pyramidalis* extract in both diets modified the rumen fermentation pattern, favoring the production of propionate and reducing acetate. The effect of the extract on the degradability of crude protein was more impressive in the high NFC diet, with a reduction of crude protein degradability with increasing levels of *P. pyramidalis*. The neutral detergent fiber degradability was favored up to the level of 2.16% of extract and, from that level decreased.

Key words: ammonia. Degradability. Fermentation kinetics. Plant extracts. *Poincianella pyramidalis* (Tul.). Short-chain fatty acids

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nos sistemas de produção de ruminantes a alimentação pode responder por 60 a 70% dos custos da atividade, sendo assim, a avaliação nutricional dos alimentos e a formulação de dietas balanceadas, que atendam às exigências dos animais representam um importante desafio na produção pecuária. Além disso, o fornecimento de uma dieta equilibrada nutricionalmente pode contribuir com a redução dos problemas ambientais, haja vista que a excreção de nutrientes não digeridos e a emissão de gases afeta o meio ambiente.

Contudo, vale salientar que a quantidade e o tipo de nutrientes disponíveis para absorção e, conseqüentemente, para produção, geralmente diferem consideravelmente do perfil de nutrientes ingeridos pelos ruminantes. Essas diferenças são resultantes das intensas atividades fermentativas desempenhadas pelos microrganismos ruminais. Assim, a microbiota e os produtos finais da fermentação ruminal representam uma parte importante do suprimento total de nutrientes disponíveis. A avaliação apropriada dos alimentos e sua taxa de fermentação e/ou digestão nos ruminantes, é a chave para o sucesso na formulação de dietas, tanto em termos de suplemento adequado de nutrientes, como do ponto de vista da formulação de dietas de baixo custo.

A redução de custos com a alimentação e a melhoria na conversão alimentar também é possível por meio da manipulação e melhoria da eficiência da fermentação ruminal. Isto inclui aumentar o propionato no rúmen, reduzir a metanogênese e diminuir a rápida proteólise ruminal e a desaminação de proteínas da dieta.

Durante anos, os produtores de ruminantes lançaram mão de estratégias como o uso de ionóforos, principalmente monensina, obtendo-se efeitos benéficos sobre a saúde e o desempenho dos animais. Contudo, na tentativa de reduzir o risco de aparecimento de resíduos químicos em produtos de origem animal e o desenvolvimento de bactérias resistentes à essas substâncias, a União Europeia (UE 1831/2003) proibiu, em 2006, o uso de antibióticos na alimentação animal. Isto fez com que se tornasse cada vez mais comum, a busca por alternativas naturais que exerçam influência sobre os produtos da fermentação ruminal, contribuindo com a melhoria do desenvolvimento animal e, ao mesmo tempo, amenizando os problemas ambientais, principalmente relacionados à emissão de gases contribuintes do aquecimento global.

Nesse sentido, plantas ou extratos de plantas contendo metabólitos secundários são excelentes alternativas aos antibióticos utilizados na exploração de ruminantes, pois podem modificar a fermentação ruminal e aumentar a eficiência energética da alimentação. As

substâncias presentes nesses extratos são capazes de mitigar a emissão de metano, através da redução da metanogênese e degradação da proteína ruminal.

Diversos métodos *in vitro* e *in situ* têm sido usados para avaliar a modulação da fermentação ruminal e estimar as características da degradação de alimentos e dietas destinadas à alimentação de ruminantes. Esses métodos envolvem a medição do desaparecimento do substrato durante a incubação no rúmen (*in situ*), no líquido ruminal tamponado (*in vitro*) e são principalmente medidas de ponto final. Além disso, é possível avaliar a cinética da degradação através da medição das diferenças nos resíduos em diferentes tempos de incubação.

A avaliação do valor nutricional de alimentos e dietas também é possível ser feita por meio da utilização de técnicas que medem a produção de gás. Essas técnicas medem o aparecimento de produtos da fermentação ruminal, tais como os gases dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄), ácidos graxos de cadeia curta, amônia e a biomassa microbiana. Essa técnica é reconhecida como uma das melhores técnicas *in vitro* disponíveis para descrever a cinética de fermentação dos alimentos, haja vista que a produção de gás é diretamente proporcional à fermentação microbiana do alimento. Além disso, pelo fato de poder ser medida em diferentes intervalos de tempo, a técnica possibilita analisar o modo de atuação dos microrganismos ruminais sobre as diferentes frações alimentares.

Esta tese apresenta-se dividida em três capítulos. Capítulo 1. “*Revisão de Literatura: 1. Técnicas in vitro para avaliação de alimentos e 2. Metabólitos secundários de plantas como moduladores da fermentação ruminal*”; Capítulo 2. “*Comparação dos perfis de acúmulo de gás de duas dietas usando métodos de produção de gás semiautomático e automático*”; Capítulo 3. “*Cinética de produção de gás e degradabilidade in vitro de dietas contendo extrato vegetal da Catingueira (Poincianella pyramidalis Tul. L. P. Queiroz)*”.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura: 1. Técnicas *in vitro* para avaliação de alimentos e 2. Metabólitos secundários de plantas (MSPs) como moduladores da fermentação ruminal

REVISÃO DE LITERATURA

1 TÉCNICAS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS

1.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, diversos esforços foram direcionados para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas que permitam a avaliação de alimentos e dietas que predigam com precisão, a ingestão e digestibilidade de alimentos. Essa digestibilidade pode ser avaliada usando métodos biológicos que simulam o processo de digestão dos alimentos (Getachew et al., 1998), os quais envolvem o uso direto de animais (métodos *in vivo* e *in situ*) e métodos laboratoriais, que não requerem o uso direto de animais, e simulam o ambiente ruminal e o processo de digestão utilizando fluido ruminal coletado de animais doadores (métodos *in vitro*).

Os métodos biológicos são mais significativos na avaliação do valor nutritivo dos alimentos, visto que os microrganismos e as enzimas são mais sensíveis a fatores que influenciam a taxa e a extensão da digestão do que os métodos químicos (Van Soest, 1994). De modo geral, para um método laboratorial ser considerado eficiente, ele deve ser reproduzível e correlacionar-se bem com os parâmetros medidos realmente *in vivo*.

O método *in vivo*, também conhecido como “técnica de coleta total”, consiste em fornecer, uma quantidade conhecida do alimento a um grupo de animais alojados em gaiolas individuais, de modo a permitir a medição do consumo diário de ração e da colheita total de fezes e, a partir da análise química das fezes, é possível estimar a digestibilidade da matéria seca (MS) dos alimentos ou de nutrientes específicos. Entretanto, embora a utilização de animais na avaliação da composição nutricional de alimentos para ruminantes seja o mais confiável para estimar consumo e digestibilidade dos nutrientes, ele é oneroso e demanda tempo relativamente longo para obtenção dos resultados (Silveira et al., 2009), requer grandes quantidades de alimentos, sendo inadequado para avaliação de alimentos em larga escala (Getachew et al., 2005) e afetam negativamente o bem-estar animal (Gosselink et al., 2004). Além disso, os métodos *in vivo* não são considerados rotineiros na maioria dos laboratórios e podem não ser aplicáveis para todas as situações alimentares possíveis encontradas na prática (Lopez, 2005).

Os métodos *in situ* envolve a incubação de amostras de alimentos em sacos de náilon que são colocados no rúmen ou outra porção do trato gastrointestinal de animais fistulados. Esses métodos permitem uma estimativa simples e rápida da degradação dos nutrientes no rúmen, permitindo o acompanhamento da degradação ao longo do tempo (Mehrez e Ørskov, 1977). Entretanto, eles têm se tornado cada vez menos atraentes, uma vez que envolve aspectos

relativos ao bem-estar animal, apresentam custos associados à manutenção de animais modificados cirurgicamente, além de permitir a avaliação de um número limitado de amostras (Mauricio et al., 1999).

Os métodos *in vitro*, por sua vez, são mais precisos e rápidos, e requerem menos substratos que os procedimentos *in situ*, entretanto, eles precisam de um inóculo para criar o ambiente fermentativo, o que aumenta o grau de variação (Mould et al., 2005), apresentam como vantagem ainda, o fato de não envolver o uso direto de animais e de serem menos trabalhosos e mais adequados para uma avaliação em larga escala de alimentos para ruminantes.

Esta revisão discute as técnicas mais usadas para estimar a digestibilidade e descreve em detalhes o método de produção de gás *in vitro* semiautomático de Theodorou et al. (1994), modificado por Maurício et al. (1999) e a técnica automática RF System (ANKOM Technology), que serviram como base para os experimentos relatados nesta tese.

1.2 TÉCNICAS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DE ALIMENTOS E DIETAS PARA RUMINANTES

1.2.1 Técnicas de digestibilidade

As técnicas *in vitro* são usadas para prever a digestibilidade *in vivo*, sendo desejáveis em função do custo e pelo número de amostras que podem ser analisadas a qualquer momento. Essas técnicas, para análise de rotina de alimentos, devem ser rápidas, simples de executar, reproduzíveis e produzir resultados confiáveis, além disso, devem simular todas as condições do ambiente ruminal.

A técnica de Tilley e Terry (1963) foi uma das primeiras técnicas *in vitro* desenvolvidas e a mais usada para prever a digestibilidade de forragens. A técnica se baseia em medições gravimétricas que segue o desaparecimento do substrato, componentes que podem ou não contribuir para a fermentação (Getachew et al., 2005). O método apresenta dois estágios onde, inicialmente o alimento é submetido à fermentação em solução tampão contendo fluido ruminal durante 48 h, seguido por 24 h de digestão com pepsina em solução ácida, para simular a digestão no abomaso.

O segundo estágio com solução ácida de pepsina, é utilizado para desdobrar as proteínas dos microrganismos que se desenvolveram no processo fermentativo do substrato, no entanto, deixa no resíduo, a parede celular indigerível das bactérias (Silva e Queiroz, 2002). O problema foi solucionado com a modificação proposta por Goering e Van Soest (1970), em que a digestão com pepsina é substituída por um tratamento com solução de detergente neutro, resultando em

um resíduo constituído apenas por parede indigestível, estimando assim, a digestibilidade verdadeira da matéria seca verdadeira.

O método tornou-se uma ferramenta importante na avaliação de alimentos para ruminantes e tem sido amplamente usado por causa de sua conveniência, particularmente quando é requerido um ensaio em grande escala de alimentos para animais (Getachew et al., 1998). As diversas modificações feitas no procedimento original visaram maximizar o processo de digestão visto que os sistemas *in vitro* que não maximizam a cinética da digestão podem não detectar diferenças na digestão do substrato (Grant e Mertens, 1992). Contudo, apesar de o método ter sido validado diversas vezes com valores *in vivo* (Van Soest, 1994), eles ainda apresentam algumas desvantagens em relação a outras técnicas de avaliação de alimentos como: i) fornecem uma medida de ponto final; ii) eles não fornecem informações sobre a cinética da digestão de alimentos; iii) são trabalhosos e consomem tempo e iv) envolvem o uso de líquido ruminal coletado de animais fistulados, não permitindo, portanto, resolver questões públicas sobre o bem-estar animal.

Atualmente, existe disponível no mercado um fermentador ruminal artificial desenvolvido pela Ankom, denominado Incubadora Daisy^{II} (Ankom Technology Co., Macedon, NY, EUA), apresentando como vantagens a possibilidade de analisar várias amostras ao mesmo tempo, reduzindo o labor empregado nas análises (Adesogan, 2002). Equipamento semelhante à Daisy^{II} foi desenvolvido por uma indústria brasileira, denominado incubadora TE-150 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba, SP, Brasil).

Alguns estudos comparando os valores de digestibilidade *in vivo* da MS obtidos pelo método do fermentador artificial Daisy^{II} em relação ao método tradicional de Tilley e Terry (1963) indicaram que estes produzem resultados similares (Mabjeesh et al., 2000; Santos et al., 2000). Entretanto, Silva et al. (2017) observaram valores superiores da DIVMS determinadas pelo fermentador TE-150 e incubadora Daisy^{II} em relação ao método tradicional de Tilley e Terry (1963).

De um modo geral, a digestibilidade determinada *in vitro* é ligeiramente menor que a determinada *in vivo*, em grande parte devido ao fato de as técnicas *in vitro* serem incapazes de simular adequadamente o complexo sistema digestivo dos animais. Por conta disso, faz-se necessário o uso de equações de regressão corretiva para relacionar a digestibilidade *in vitro* com a digestibilidade *in vivo* (McDonald et al., 1995).

1.2.2 Técnicas de produção de gás para avaliação de alimentos

As técnicas de produção de gás são de grande interesse na avaliação dos sistemas de produção de ruminantes, principalmente por conta de sua capacidade de avaliar a dinâmica de digestão e seu potencial para simular os processos de digestão do rúmen (Alvarez Nivea, 2000). A técnica foi originalmente desenvolvida para descrever a taxa e a extensão da fermentação da matéria orgânica (Menke et al., 1979).

Ao contrário das técnicas de digestibilidade, que visam avaliar o desaparecimento do substrato, os métodos de produção de gás medem o aparecimento de produtos da fermentação, como gases (CO_2 e CH_4), ácidos graxos de cadeia curta, NH_3 e biomassa microbiana (Makkar et al., 1995). A maior parte do gás produzido é resultado da fermentação de carboidratos a acetato, propionato e butirato (Blummel e Ørskov, 1993), com baixa contribuição da proteína para a produção gás e insignificante a quantidade de gás advindo da gordura (Getachew et al., 1998). Além disso, a quantidade de gás produzido depende da quantidade de substrato fermentado (Davies et al., 2000). Em situações onde os nutrientes não sejam limitantes, a produção de gás pode ser considerada a medida direta do crescimento microbiano, podendo ser em algumas situações, o melhor índice para medir a energia metabolizável produzida (Pell e Schofield, 1993).

Essas técnicas têm despertado o interesse de pesquisadores de diferentes áreas e disciplinas, que estudam os impactos diretos da produção animal no meio ambiente (Krishnamoorthy et al., 2005). Esse interesse surge principalmente por volta dos anos 70, onde pesquisadores descobriram que medidas de fermentação de substratos a gases combinadas com dados de composição química da dieta poderiam ser usadas para estimar tanto o conteúdo de energia metabolizável como a degradabilidade da matéria orgânica (Yáñez-Ruiz et al., 2016). A partir daí, foram desenvolvidas técnicas para avaliar não só a digestibilidade de um alimento como também os parâmetros cinéticos da digestão, baseados na liberação dos produtos da fermentação.

Menke et al. (1979) foram os primeiros a usar a produção de gás durante a fermentação de um alimento para estimar a digestibilidade aparente *in vivo*. O teste de gás de Hohenheim (Menke et al., 1979), consiste na medida direta da produção total de gás liberada pela fermentação, realizada em seringas de vidro fosco (capacidade de 100 ml), contendo 200 mg de alimento incubado com líquido ruminal tamponado. À medida que o substrato é fermentado, são produzidos gases e o êmbolo da seringa é forçado a subir no interior do cano (Theodorou et al., 1994). Este sistema de avaliação combina o volume total de gases produzidos após 24 h de incubação com a concentração de proteína bruta (PB), gordura bruta, fibra bruta e cinzas da

ração para prever a energia metabolizável (EM) (Williams, 2000). O teste é semelhante ao sistema de Tilley e Terry (1963), onde o substrato é incubado com líquido ruminal, sendo a principal diferença entre os métodos, o fato de a produção de gás ao invés de perda de matéria seca, descreve a quantidade de substrato fermentado.

O teste de gás de Hohenheim, por sua vez, pode ser adaptado para refletir a extensão e a taxa da fermentação, pela simples leitura do aumento na produção de gás indicado pela subida do êmbolo em uma série de intervalos de tempo escolhidos. Sendo assim, Blummel e Ørskov, (1993) realizaram uma modificação no método de Menke et al. (1979) visando avaliar a cinética de produção de gás *in vitro*. Nesse novo procedimento, as seringas foram incubadas em banho-maria coberto com uma tampa de acrílico, equipada com orifícios para manter as seringas eretas no banho-maria. Além disso, ao invés de uma única leitura dos gases, realizada 24 h após a incubação, a produção de gás foi registrada nos tempos 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 h. Os autores observaram que a produção de gás, registrada em diferentes intervalos de tempo, ajustou-se bem aos resultados da técnica do saco de náilon utilizando o mesmo material relatado anteriormente por Ørskov et al. (1988).

O uso de sistemas manuais utilizados para avaliar tanto a digestibilidade como a cinética de degradação dos alimentos apresentam resultados satisfatórios e são bem correlacionados com valores obtidos *in situ* e *in vivo*, contudo, eles requerem um trabalho maior de manipulação manual de seringas e dependem de uma boa precisão da leitura dos volumes de gás dentro de seringas (Cone et al., 1996), o que pode afetar potencialmente o perfil de produção de gás de um alimento (Rymer et al., 2005).

1.2.2.1 Técnicas semiautomáticas de produção de gás

Durante anos, a produção de gás foi medida manometricamente (McBee, 1953; Czerkawski e Breckenridge, 1970) e volumetricamente (Menke e Steingass, 1988), com registros manuais dos resultados. O método manométrico de medição de gás desenvolvido por McBee (1953) permitiu aos autores avaliar a atividade microbiana ruminal com relação à fermentação da celulose e hemicelulose, chegando a conclusão de que a taxa de fermentação de vários substratos no rúmen não é constante, mas sujeita a grandes flutuações após mudanças na dieta do animal. Por sua vez, Cone et al. (2012) verificaram que a síntese de proteína microbiana no rúmen depende do grau e da taxa de fermentação dos substratos, sendo a maior produção ocorrendo com substratos de fermentação rápida.

Com o avanço das pesquisas, formas alternativas para medir a produção de gás foram desenvolvidas, onde aumentos de pressão foram sendo registrados em sistemas fechados. Com

isso, foram desenvolvidos métodos simples para medição de gás e que pudesse diminuir os erros obtidos a partir de leituras manuais da pressão do gás gerado (Wilkins, 1974). O método consistia na incubação de amostras de ração em frascos fechados, onde a produção de gás era obtida usando um transdutor de pressão que media o acúmulo da pressão do gás no headspace do frasco.

Posteriormente, essa metodologia foi aperfeiçoada por Pell e Schofield (1993), sendo os gases acumulados em frascos de volume fixo (50 ml), cada um com seu próprio agitador. Como o sistema não é ventilado, o gás acumula-se no headspace, durante 48 horas, e a pressão é medida de forma semiautomática a cada hora. Segundo Theodorou et al. (1998), a falta de ventilação do método, poderia resultar na subestimação das medidas, uma vez que, com alimentos altamente e rapidamente fermentáveis, altas pressões podem ser geradas dentro do sistema, o que poderia perturbar e reduzir a atividade microbiana do fluido ruminal. Essa subestimação da produção de gás *in vitro* em sistemas fechados, o qual ocorre altas pressões, está relacionado ao fato de uma parte do CO₂ ser dissolvida no fluido de fermentação, levando a uma possível superestimação da proporção de CH₄ no gás total (Cattani et al., 2014).

Em função disso, Theodorou et al. (1994) descreveram um método de produção de gás, o qual usava um transdutor de pressão e um conjunto de seringa à prova de gás para medir e liberar as pressões de gases acumuladas dos frascos de cultura de 160 ml. À medida que a fermentação ocorria, o gás era acumulado no headspace das garrafas, sendo ventilado em tempos fixos (2, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 h de incubação) e a produção de gás registrada por um transdutor de pressão ligado a um voltímetro de leitura digital. Este método, apesar de tecnicamente direto, era trabalhoso, uma vez que leituras frequentes eram necessárias, especialmente durante os estágios iniciais da fermentação (Davies et al., 2000).

A técnica desenvolvida por Theodorou et al. (1994) sofreu uma modificação por Mauricio et al. (1999), na qual eliminou-se a necessidade de medir o volume de gás com uma seringa, sendo as leituras da pressão do gás no headspace obtidas através da inserção de agulha hipodérmica de um transdutor de pressão manual no frasco de fermentação, conectado a um display visual que faz interface com um computador usando um conversor k485, permitindo a captura direta dos dados. Para descrever o gás acumulado no headspace e o perfil de degradação do substrato, nos termos da taxa fracional dependente do tempo da produção do gás (μ), fase lag (L) e potencial de produção de gás/degradação (A). Com essa modificação, foi possível reduzir consideravelmente o tempo necessário e o erro potencial associado à estimativa da quantidade de gases liberados na fermentação, além de ter aumentado substancialmente a capacidade do sistema atual (336 frascos ou 75 substratos + controles por série de incubação).

As técnicas semiautomáticas fornecem resultados acurados, precisos e de fácil obtenção. Em relação à técnica de Menke, os sistemas semiautomáticos tem a vantagem de medir mais precisamente, pequenos volumes de gás, ou seja, enquanto a técnica de Menke emprega seringas de 100 ml, vários tamanhos de seringas podem ser empregadas na técnica do transdutor de pressão e a capacidade de corrigir todas as medições de volume de gás de acordo com a correspondente pressão no headspace do frasco. Contudo, assim como na técnica de Menke, a técnica do transdutor de pressão tem como principal desvantagem, a necessidade de registros da produção de gás em intervalos frequentes, principalmente durante o período inicial de incubação, demandando um alto requisito de trabalho. Para superar esse problema, tem sido desenvolvidos vários sistemas automatizados para registro da produção de gás.

1.2.2.2 Técnicas automáticas de produção de gás

Além dos sistemas semiautomáticos, também têm sido desenvolvidos diversos sistemas automatizados para medir a produção de gás. Beuvink et al. (1992) desenvolveram um sistema de deslocamento de líquido, que utilizou frascos de soro de 100 ml, conectados a garrafas de deslocamento de água e o recipiente era colocado sobre uma balança. As leituras foram feitas a cada 25 min quando o peso do líquido deslocado pelo gás foi registrado e armazenado em um “data-logger”. As garrafas foram mantidas em banho-maria agitadas durante a fermentação. No entanto, esses sistemas de deslocamento de líquido são tecnicamente difíceis de manter e têm uma resistência interna relativamente alta, introduzindo uma *lag time* artificial (Cone et al., 1996).

Davies et al. (1995) desenvolveram um sistema de avaliação da pressão automatizado (APES) para medir a produção de gás resultante da fermentação de forragens. O sistema consiste na incubação de 0,5 a 1,5 g de substrato teste em frascos de 140 ml contendo 90 ml de meio e 10 ml de fluido ruminal. Diferentemente do que ocorre no sistema desenvolvido por Pell e Schofield (1993), o gás acumulado no headspace das garrafas, é liberado automaticamente, pelo uso de chaves sensíveis à pressão e válvulas solenoides, quando uma dada pressão pré-determinada é atingida. Nesse sistema, a pressão interna nas garrafas nunca ultrapassa o nível definido de 4,5 kPa, evitando assim, problemas associados com o aumento da solubilidade do gás a uma pressão aumentada (lei de Henry; Theodorou et al., 1998).

Um sistema de produção de gás relacionado ao tempo totalmente automatizado foi apresentado por Cone et al. (1996) para estudar a cinética de fermentação no fluido ruminal. O sistema faz uso de transdutores eletrônicos de pressão em combinação com válvulas elétricas para liberar a pressão durante a incubação. Pelo fato de ser muito sensível, o sistema não permite

que ocorra o acúmulo de gás e de pressão. Cada abertura da válvula representa uma certa quantidade de gás, definida em cerca de 0,7 ml. Registrando o número de aberturas de válvulas no tempo, a cinética da degradação pode ser estudada.

Recentemente a empresa Ankom Technology® (Ankom, 2011) desenvolveu um sistema de produção de gás (ANKOM^{RF} Gas Production System) projetado para medir a cinética da fermentação microbiana de forma automatizada, que possibilita realizar o monitoramento da pressão do gás dentro de múltiplos Módulos, sendo os dados registrados diretamente em planilhas de computador (Figura 1). O sistema tem capacidade para incluir até 50 módulos individuais que comunicam informações a um computador usando transmissão de radiofrequência (RF). A partir da interface do computador, o operador pode controlar diversas variáveis, como intervalos de registro de dados e a liberação automática de pressão através de válvulas internas em cada módulo.

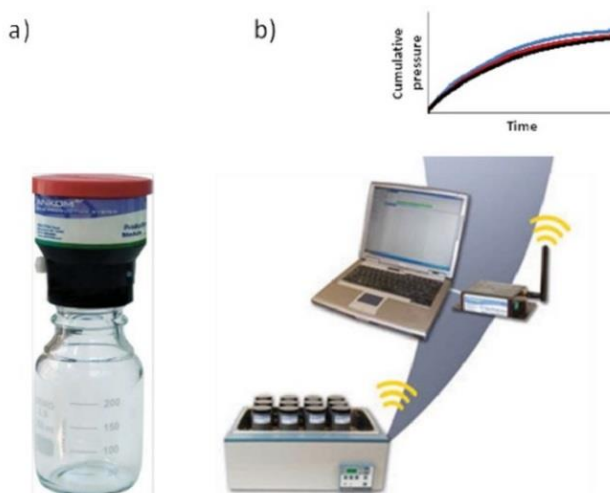


Figura 1 – Ilustração de um módulo de produção de gás sem fio *in vitro*. O módulo de produção de gás (a) mede a pressão da fermentação no jarro continuamente e libera gás em um determinado ponto de ajuste acima da pressão atmosférica. Os dados são transferidos sem fio de todos os módulos, que podem ser incubados em banho-maria ou em uma incubadora (b). (Fonte: Storm et al., 2012).

As principais diferenças entre os sistemas automatizados, diz respeito à suas capacidades e se os frascos são ventilados de acordo com uma dada pressão limiar ou intervalo de tempo (Cone et al., 1996) ou permanecem fechados e a pressão é acumulada no sistema (Pell e Schofield, 1993). Apesar de suas vantagens na avaliação de alimentos, os sistemas totalmente automatizados apresentam um elevado custo inicial, e sua complexidade e as dificuldades de manutenção tornam estes sistemas inadequados para muitos laboratórios.

2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS (MPS) COMO MODULADORES DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

2.1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal dos ruminantes, particularmente o retículo-rúmen, é caracterizado por apresentar um ambiente microbiano diverso, constituído por bactérias, fungos, protozoários e outros microrganismos. Isso possibilita a esses animais digerir grandes quantidades de polissacarídeos vegetais, muitas vezes de baixa qualidade, fermentando-os a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e proteína microbiana, atendendo assim, suas necessidades energéticas e proteicas. Esse processo de fermentação ruminal, mediado pelos microrganismos ruminais, afeta a qualidade e a composição do leite e da carne e o desempenho produtivo do hospedeiro.

Uma vez que a fermentação ruminal desempenha um papel chave na nutrição de ruminantes, estratégias de manipulação da fermentação de modo a melhorar o desempenho das espécies domésticas, principalmente bovinos, ovinos e caprinos, tem despertado o interesse de pesquisadores (Chalupa, 1977). Esta melhoria da eficiência da fermentação ruminal inclui aumentar a produção de ácido propiônico ruminal, reduzir a metanogênese e a rápida proteólise ruminal e a desaminação das proteínas da dieta (Azzaz et al., 2015).

Tem sido proposto que metabólitos secundários de plantas (MSPs), tais como taninos, saponinas e óleos essenciais, apresentam potencial para modular a fermentação. Esses metabólitos têm sido amplamente explorados na produção de ruminantes por contribuir com a melhoria da eficiência energética e aumento da proteína não degradável no rúmen, aumentando assim, a produção de proteína microbiana e o fluxo de proteína para o duodeno (Wallace, 2004).

Diversos trabalhos tem sido desenvolvidos no intuito de verificar a influência desses metabólitos secundários sobre os parâmetros fermentativos ruminais (Spanghero et al., 2008; Tan et al., 2011; Cieslak et al., 2012; Kim et al., 2014; Rira et al., 2015), obtendo-se diferentes respostas nos estudos realizados, muitas delas em função do tipo e outras em função da concentração do metabólito avaliado.

2.2 DESCRIÇÃO GERAL DOS MSPs

Os metabólitos secundários representam uma ampla gama de compostos químicos presentes em plantas. Eles são moléculas biologicamente ativas, não envolvidas em processos bioquímicos primários, tais como o crescimento, desenvolvimento e reprodução (Bodas et al., 2012), mas que são essenciais à sobrevivência das plantas devido às suas propriedades defensivas, incluindo resistência contra patógenos e herbívoros, bem como à radiação UV (Stafford, 1991).

O metabolismo secundário das plantas abrange todas as facetas fisiológicas e bioquímicas dos "produtos secundários", incluindo aspectos funcionais e evolutivos (Hartmann, 2007). Atualmente, mais de 200.000 estruturas definidas de metabólitos secundários de plantas foram identificadas (Hartmann, 2007; Lattanzio, 2013). A maioria desses metabólitos possui atividade biológica em outros organismos vivos, afetando algum dos processos metabólicos do animal e/ou a taxa de crescimento de certos microrganismos.

Esses compostos têm sido rotineiramente objeto de estudo das áreas da indústria farmacêutica e da nutrição animal, no intuito de obter novos medicamentos ou aditivos alimentares (Bodas et al., 2012). Entretanto, a utilização de aditivos naturais na alimentação de ruminantes é aceitável apenas em doses que exerçam efeitos positivos sobre as populações microbianas, sem apresentar efeitos adversos sobre a fermentação ruminal (Spanghero et al., 2008).

Os principais metabólitos secundários presentes em plantas ou seus extratos, de interesse na nutrição de ruminantes são taninos, óleos essenciais e saponinas.

Os taninos fazem parte da ampla família de polifenóis ricos em anéis aromáticos com grupos hidroxila. Taninos são substâncias polifenólicas solúveis em água, de pesos moleculares diversos e complexidade variável (Goel e Makkar, 2012). Eles são classificados em duas famílias químicas principais: Taninos Hidrolisáveis (TH) e as proantocianidinas, também conhecidos como taninos condensados.

Os taninos hidrolisáveis se caracterizam por apresentar um núcleo de poliol central (comumente *D*-glicose), que é esterificado com ácidos fenólicos (principalmente ácido gálico ou hexa-hidroxifenílico) (Amarowicz e Janiak, 2018). Esses taninos são suscetíveis à hidrólise ácida, básica ou por esterases, podendo ser facilmente degradados e absorvidos no trato digestivo, além de poder causar potenciais efeitos tóxicos em herbívoros. Os taninos hidrolisáveis são classificados em dois subgrupos: derivados de galotaninos e elagitaninos. A designação de "taninos hidrolisáveis" para galotaninos e elagitaninos deve-se ao fato de estes compostos poderem ser hidrolisados, liberando ácido gálico e/ou ácido elágico, através de um tratamento com ácido diluído, enquanto os taninos condensados não são (Ky et al., 2016).

As duas subclasses de taninos hidrolisáveis, galotaninos e os elagitaninos, são derivados da 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- β -*D*-glicose (Niemetz e Gross, 2005). Os galotaninos (GTs) são polímeros formados pela esterificação subsequente de grupos hidroxila de *D*-glicose e ácido gálico em cadeias poliméricas, nas quais as metades galoil são ligadas pelas chamadas ligações "depsidas" (Amarowicz e Janiak, 2018). Outros tipos de galotaninos são formados pela esterificação do ácido chiquímico e ácido quinico com ácido gálico. Os galotaninos podem

interagir com proteínas, envolvendo preferencialmente, ésteres de galoil de maior peso molecular.

Os elagitaninos (ETs) são ésteres do ácido hexa-hidroxi-difenol (HHDP) e poliol, como a glicose ou o ácido quínico. Após a hidrólise, a molécula de ET liberada do ácido HHDP é espontaneamente rearranjada para um composto insolúvel em água, o ácido elágico (Amarowicz e Janiak, 2018). Eles apresentam uma enorme variabilidade estrutural devido aos múltiplos locais possíveis para a ligação dos resíduos de HHDP com a porção glicose, e particularmente pela sua forte tendência para formar derivados diméricos e oligoméricos (Shahat e Marzouk, 2013).

Os taninos condensados (proantocianidinas) são os polifenóis derivados de plantas mais abundantes. As proantocianidinas são oligômeros ou polímeros de flavan-3-ol, onde as unidades monoméricas são ligadas principalmente por ligações $C-4\alpha \rightarrow C-8$, embora com menor frequência também sejam encontradas ligações $C-4\alpha \rightarrow C-6$, levando à formação das proantocianidinas do tipo B. Por outro lado, as proantocianidinas tipo A se caracterizam por apresentar uma ligação adicional entre $C-2 \rightarrow C-7$ das unidades básicas de flavan-3-ol (Figura 11) (Smeriglio et al., 2017).

Contudo, vale destacar que diversos fatores podem afetar as estruturas químicas e as concentrações de taninos, tais como a espécie de planta, estágio de crescimento e condições de crescimento (temperatura, intensidade luminosa, estresse nutricional e exposição à herbivoria) (Berard et al., 2011; Li et al., 2014). Essas substâncias apresentam tanto efeitos prejudiciais como benéficos, o qual depende de sua concentração, tipo e natureza do tanino, além de outros fatores tais como espécie animal, estado fisiológico do animal e composição da dieta (Min et al., 2003).

Os óleos essenciais, por sua vez, são substâncias aromáticas voláteis produzidas por plantas, como misturas complexas de metabólitos secundários (Cobellis et al., 2016). Quimicamente, os óleos essenciais são metabólitos secundários compostos principalmente por derivados do isopreno, como monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (15), ou compostos aromáticos de baixo peso molecular. Essas substâncias apresentam considerável potencial para substituir os aditivos químicos, melhorando o desempenho, a eficiência alimentar e prevenindo futuros danos à saúde dos consumidores (Ornanghi et al., 2017).

As saponinas são grupos heterogêneos de glicosídeos amplamente distribuídos no reino vegetal, incluem um grupo diversificado de compostos caracterizados pela sua estrutura contendo uma aglicona esteroidal ou triterpenóide e uma ou mais unidades osídicas (Guçlu-Ustundag e Mazza, 2007). Elas possuem propriedades tenso-ativas ou detergentes porque a

porção osídica da molécula é solúvel em água, enquanto a aglicona é lipossolúvel (Savage, 2003). Quando fornecidas em alto nível, as saponinas podem ter efeitos adversos na população microbiana do rúmen e saúde animal (Wang et al., 2000), enquanto em baixas concentrações apresentam potencial para melhorar a fermentação ruminal (Sen et al., 1998), diminuindo a concentração de metano e N amoniacal e aumentando a produção de massa microbiana (Hu et al., 2005).

2.3 EFEITOS GERAIS DOS MSPs SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL

A exploração de metabólitos secundários de plantas como aditivos naturais na dieta de ruminantes tem se tornado cada vez mais comum entre os nutricionistas e microbiologistas do rúmen, visando modificar favoravelmente a fermentação ruminal, através da inibição da metanogênese, melhoria no metabolismo de proteínas e aumento do conteúdo do ácido linoleico conjugado (CLA) em alimentos derivados de ruminantes.

A comunidade microbiana ruminal é composta principalmente por dois grupos de procariotos (bactérias e archaeas) e dois grupos de eucariotos (protistas, fungos e outros microrganismos). Bactérias e protistas, juntos, representam mais de 90% da biomassa microbiana, e as bactérias, em particular, têm sido o foco da maioria dos estudos quantitativos sobre a composição da comunidade (Weimer, 2015).

Esses diferentes microrganismos ruminais degradam nutrientes produzindo ácidos graxos de cadeia curta e sintetizam proteínas microbianas, como fonte de energia e proteína para o ruminante, respectivamente (Calsamiglia et al., 2007). No entanto, o processo de fermentação tem ineficiências de energia (produção de metano) e proteína (perdas de N amoniacal) que podem limitar o desempenho da produção e contribuir para a liberação de poluentes para o meio ambiente. Assim, a modificação da fermentação ruminal ocorrerá como uma consequência direta dos MSPs sobre a microbiota ruminal (Bodas et al., 2012).

Apesar da atividade antibacteriana ter sido relatada em uma ampla variedade de substâncias não fenólicas, os compostos fenólicos são os principais componentes ativos (Burt, 2004). Acredita-se que o modo de ação antimicrobiano provém principalmente do potencial da sua intrusão na membrana celular bacteriana, desintegrando as estruturas de membrana e provocando a saída de íons (Bodas et al., 2012).

Os taninos apresentam uma forte ação antimicrobiana, sendo essa atividade específica das espécies microbianas e está intimamente relacionada à sua composição química e estrutura (Huang et al., 2017), sendo os taninos de baixo peso molecular mais hábeis em inibir os microrganismos ruminais (Patra e Saxena, 2011).

Os taninos formam complexos com proteína no rúmen, aumentando a quantidade de proteína disponível para a digestão no intestino delgado (Muller-Harvey, 2006), e também com carboidratos estruturais, devido à presença de um grande número de grupos hidroxila fenólicos (Patra e Saxena, 2011), protegendo o substrato da degradação microbiana. Esses compostos também podem agir sobre enzimas como um inibidor competitivo do seu sítio ativo ou como um inibidor não competitivo que modificará a conformação do sítio ativo da enzima para bloquear o acesso do substrato (Marion, 2016). Além disso, eles podem diminuir a produção de metano (CH_4) e aumentar as concentrações de CLA em alimentos derivados de ruminantes (Cieslak et al., 2012).

Carrasco et al. (2017) mostraram que a adição de taninos na dieta de bovinos da raça holandesa alterou as comunidades bacterianas fibrolíticas, amilolíticas e ureolíticas no rúmen, enquanto as archaeas metanogênicas foram reduzidas. Além disso, o pH ruminal foi significativamente maior nos animais suplementados com taninos em comparação ao grupo controle.

Avaliando diferentes fontes de taninos, Bhatta et al. (2009) observaram uma redução média de 11,6% e 12,3% na população de archaeas metanogênicas e protozoários, incubados com taninos hidrolisáveis, e de 28,6% e 36,2% nas incubações contendo taninos hidrolisáveis e condensados, respectivamente, quando comparados com incubações contendo polietilenoglicol-6000. Além disso, os taninos também aumentaram o pH *in vitro*, reduziram as concentrações totais de AGCC e de N-NH_3 e tenderam a aumentar as concentrações de propionato.

O pH ruminal perto da neutralidade permite a interação entre taninos condensados solúveis e proteína, o que acaba por aumentar a eficiência da utilização de proteínas. Geralmente, pH entre 3,5 e 7,0 favorece a formação de complexo tanino-proteína, enquanto que em valores de pH fora dessa faixa o complexo é dissociado e a proteína é liberada (Jones et al., 1976).

A suplementação de 140 g de extrato de *Vaccinium vitis idaea*, contendo o equivalente a 2 g de taninos / kg de MS dietética reduziu a concentração de amônia (-45,9%) e a população de protozoários (-35,0%) *in vivo*, enquanto a contagem total de bactérias e metanogênicos não foi afetada (Cieslak et al., 2012). Gross e Brinkhaus et al. (2016) observaram uma diminuição no N-NH_3 ruminal em vacas alimentadas com sainfoína em comparação com vacas alimentadas com trevo de gramíneas e alfafa. Da mesma forma, Theodoridou et al. (2010) observaram uma diminuição no N-NH_3 no fluido ruminal de ovinos alimentados com sainfoína fresca em comparação com ovelhas alimentadas com a mesma dieta adicionada com polietilenoglicol. A

menor produção de amônia (N-NH_3), na presença de taninos, é resultado da menor degradação de proteínas e consequentemente menor desaminação de aminoácidos, resultando em mais proteína que sai do rúmen e atinge o abomaso (Marion, 2016).

Assim como os taninos, os óleos essenciais são potencialmente promissores alternativas naturais aos antibióticos e ionóforos para manipular a fermentação ruminal devido à sua capacidade de modificar a permeabilidade celular em microrganismos e sua toxicidade a algumas cepas de microrganismos do rúmen, particularmente as bactérias gram-negativas (Helander et al., 1998; Calsamiglia et al., 2007). Foi sugerido que o principal mecanismo de ação dos óleos essenciais era a inibição da ligação bacteriana às partículas alimentares e, subsequentemente, a diminuição da produção de N-NH_3 (desaminação) a partir dos aminoácidos (Wallace et al., 2002).

A ação dos óleos essenciais pode ocorrer em função da sua composição química, sendo que o mesmo extrato pode apresentar efeitos estimulatórios ou inibitórios quando for proveniente de diferentes espécies de plantas do mesmo gênero (Patra e Saxena, 2009b). Em função dessa grande diversidade de compostos envolvidos, existem diversos mecanismos químicos responsáveis pela inibição do crescimento microbiano a partir dos óleos essenciais (Calsamiglia et al., 2007).

Assim, Spanghero et al. (2008) verificaram que o aumento, *in vitro*, dos níveis de óleos essenciais causaram uma mudança moderada nos produtos finais da fermentação, ocorrendo uma redução na proporção de acetato e na razão acetato: propionato, sem entretanto, modificar a proporção de butirato. Agarwal et al. (2009) reportaram que o óleo de hortelã-pimenta em níveis elevados (1,0 e 2,0 $\mu\text{l/ml}$ de meio de incubação) aumentou a proporção de acetato e diminuiu a de propionato, enquanto o nível de 0,33 $\mu\text{l/ml}$ não apresentou efeito.

Porém, as modificações ocorridas nos parâmetros fermentativos ruminais, como a modificação na produção de AGCC, devido à alimentação com óleo essencial, são mais evidentes em situações de baixo pH ruminal, sugerindo que a forma hidrofóbica não dissociada das moléculas ativas essenciais do óleo é mais ativa contra a membrana da célula de microrganismos do rúmen (Cardoso et al., 2005; Spanghero et al., 2008).

As saponinas também apresentam potencial para modular a fermentação ruminal e melhorar a utilização de nutrientes em ruminantes (Patra e Saxena, 2010). Tem sido demonstrado *in vitro* (Liu et al., 2003; Lila et al., 2003) e *in vivo* (Hristov et al., 2003) que as saponinas podem reduzir o pH e a concentração de N-NH_3 e aumentar a proporção de propionato no rúmen. Segundo Sen et al. (1998), a atividade biológica das saponinas depende não somente da estrutura da aglicona lipofílica, mas também da composição e posição de

fixação do açúcar. Além disso, a resposta dos ruminantes às saponinas dependerá de fatores tais como fontes e níveis de suplementação e composição da dieta ofertada (Wina et al., 2005).

As saponinas são capazes de modular as comunidades microbianas do rúmen, estimulando o crescimento de algumas bactérias celulolíticas e diminuindo a população de protozoários (Patra et al., 2012). Segundo Moss et al. (2000), os protozoários são os microrganismos ruminais mais suscetíveis a alterações induzidas por saponinas nas propriedades da membrana celular.

Hu et al. (2005) observaram uma redução de 16% na contagem de protozoários na presença de 0,4 mg de saponinas de chá / L de fluido ruminal. Além disso, a saponina de chá diminuiu a concentração de N-NH₃ (8,3%) e aumentou a massa de proteína microbiana (18,4%). Da mesma forma, Belanche et al. (2016) observaram que a inclusão de saponinas de frutos de hera (2 g/L) diminuiu a atividade protozoária (-39%) e a concentração de N-NH₃ (-56%). Segundo Wina et al. (2005), o mecanismo que explica o possível efeito das saponinas sobre os protozoários está relacionado ao fato de essas substâncias formarem complexos irreversíveis com a membrana da célula protozoária causando ruptura e lise celular. Contudo, o efeito antiprotozoário das saponinas é transitório, pois quando as saponinas são desglicosiladas pelos microrganismos do rúmen para a sapogenina, tornam-se inativas (Patra e Saxena, 2009a; Ramos-Morales et al., 2017).

Os valores de pH e as concentrações de AGCC e N-NH₃ no rúmen são parâmetros importantes que refletem o ambiente da fermentação ruminal. Além disso, a produção de AGCC no rúmen depende do grau e da taxa de fermentação (Cone e Becker, 2012). Kang et al. (2016) observaram que a inclusão de saponinas de *Momordica charantia* (MCS), até 0,6 mg de saponinas por ml de fluido de incubação, diminuiu a proporção molar de propionato (-12,08%) e a concentração de AGCC totais (-42,07%), mas aumentou a proporção de acetato (+16,06%), o que levou a uma maior razão A:P às 24 h de incubação. Por outro lado, após 48 h de incubação, a inclusão de MCS aumentou a proporção molar de propionato e diminuiu a proporção de acetato, resultando numa menor razão A:P.

Por sua vez, Ramos-Morales et al. (2017b) observaram que adição de extratos de frutos de hera (*Hedera helix*) (1 g de extrato / 7,5 ml de fluido ruminal) aumentou a proporção molar de propionato (+28,07%) e reduziu a proporção molar de butirato (-9,7%). Além disso, a quantidade total de AGCC foi aumentado em 13,2% na presença de saponinas de frutos de hera. Da mesma forma, Belanche et al. (2016) observaram um aumento de 25,5 e 11,3% na proporção molar de propionato e AGCC, respectivamente, quando utilizou 2 g de saponinas de fruto de hera por L de fluido ruminal. O aumento dos AGCC em níveis mais elevados de saponinas é,

provavelmente, devido à degradação parcial de saponina pelos microrganismos do rúmen (Wina et al., 2005), sendo a porção de açúcar, posteriormente, utilizada e fermentada para produzir AGCC.

2.4 EFEITO DOS MSPs SOBRE A PRODUÇÃO DE METANO (CH₄)

Nos últimos anos, consideráveis esforços têm sido feitos para controlar as emissões de gases responsáveis pelo aquecimento global. Cerca de 10 a 12% dessas emissões globais de gases do efeito estufa, expressos como equivalentes de CO₂, advém da agricultura, sendo o maior contribuinte o gás CH₄ entérico dos ruminantes (Veneman et al., 2016). Contudo, vale salientar que cerca de 90% da produção mundial de CH₄ pelos ruminantes é resultado da fermentação de alimentos de baixa qualidade (Mueller-Harvey, 2006). Assim, a manipulação de dietas de ruminantes com alto valor nutritivo em sistemas agrícolas intensivos teria pouco efeito sobre a produção mundial de metano (Van Soest, 1994).

Além do metano entérico, outros produtos como acetato, propionato e butirato são produzidos como resultado da fermentação de material vegetal pelos ruminantes. Enquanto os AGCC são absorvidos e metabolizados pelos animais, o gás CH₄ escapa através da eructação e respiração dos animais para atmosfera (Duin et al., 2016). O CH₄ tem um potencial de aquecimento global de 28 a 34 vezes maior que o dióxido de carbono (CO₂) (Ungerfeld, 2018), sendo que estratégias para diminuir as emissões antropogênicas de CH₄ são consideradas primordiais para mitigar as mudanças climáticas. Além disso, cerca de 2-15% da ingestão de energia é perdida como resultado da produção desse gás (Holter e Young, 1992), sendo essa, uma das mais importantes ineficiências nos sistemas de produção de ruminantes (Moss et al., 2000).

Dentre as estratégias nutricionais para mitigação das emissões de CH₄, a suplementação dietética com compostos bioativos de plantas, a exemplo dos taninos condensados, óleos essenciais e saponinas, tem se mostrado importantes para ruminantes, devido à sua origem natural em oposição aos aditivos químicos.

Os diferentes tipos de fitoquímicos inibem o metano por diferentes modos, resultando em diferentes padrões de fermentação ruminal. Uma diminuição na produção de metano pelos fitoquímicos pode ser confundida com vários fatores, tais como a supressão de protozoários, archaeas e populações microbianas produtoras de hidrogênio e diminuição da digestão de fibras no rúmen (Patra, 2010).

2.4.1 Efeito dos taninos sobre a produção de CH₄

A avaliação dos efeitos nutricionais de taninos é complicada devido à sua grande diversidade estrutural, sendo muitas vezes ignorado ou não suficientemente apreciado em muitos ensaios de alimentação, o que tem levado a confusão considerável na literatura (Mueller-Harvey, 2006). Além disso, embora os taninos pareçam promissores para a mitigação de CH₄, eles impedem a digestibilidade da forragem e a produtividade animal quando oferecidos em concentrações elevadas, limitando seu futuro uso em larga escala (Beauchemin et al., 2008).

O potencial de diferentes tipos de taninos, presentes em diferentes espécies de plantas tropicais, em modificar os parâmetros da fermentação ruminal, particularmente mitigando a produção de CH₄ no rúmen, se dá de três formas básicas: quando administrados aos ruminantes como forragem contendo tanino (Puchala et al., 2005), como extratos de tanino testados *in vitro* (Pellikaan et al., 2011) ou quando alimentados *in vivo* (Bhatta et al., 2013).

Além disso, existem dois modos de ação dos taninos sobre a síntese de CH₄ (metanogênese): um efeito direto sobre os metanogênicos do rúmen e um efeito indireto na produção de hidrogênio (H₂), devido à menor degradação de alimento (Wanapat et al., 2013). O H₂ juntamente com o CO₂ produzidos, são os principais substratos utilizados pelos metanogênicos, sendo considerada a via predominante de produção de CH₄ no rúmen (Ellis et al., 2008). Carulla et al. (2005) sugeriram que a inibição de metanogênicos por taninos condensados (TC) foi principalmente o resultado da supressão da degradação da fibra que limita o H₂ derivado da síntese de acetato. Há também evidências de que alguns taninos condensados podem reduzir as emissões de metano, reduzindo o inchaço e aumentando a absorção de aminoácidos no intestino delgado (Wanapat et al., 2013).

Tan et al. (2011) verificaram que a inclusão de taninos condensados (3% da MS) de *Leucena* reduziu em 47% a produção de CH₄ e em apenas 7% a degradação da MS dietética. Contudo, maiores níveis de TC, além de reduzir a emissão de metano, resultaram em efeitos negativos substanciais sobre a digestibilidade da MS. Por sua vez, Cieslak et al. (2012) observaram que os taninos condensados de *Vaccinium vitis idaea* L.A reduziram em 8,46%, a produção ruminal de CH₄. Também Puchala et al. (2005) observaram que a alimentação de *Lespedeza cuneata* (180g CTs kg⁻¹) resultou em menor emissão de metano, seja quando expresso como quantidade por dia (7,4 vs 10,6 g/dia) ou em relação a ingestão de MS (6,9 vs 16,2 g/kg MS ingerida), comparado com a dieta contendo *Digitaria ischaemum* (Schreb.). Entretanto, nos estudos de Beauchemin et al. (2007), a emissão de CH₄ por novilhas e novilhos em crescimento não foi afetada pela adição de extratos contendo taninos condensados.

Estas discrepâncias observadas na produção de CH₄ pode ser causada pelos diferentes tipos de taninos testados, condensados vs hidrolisáveis, bem como pela fonte originária e o nível de suplementação (Patra e Saxena, 2011). Entretanto, as tentativas de atribuir os efeitos nutricionais às classes de tanino, não provaram ser úteis, mas a percepção de que os taninos hidrolisáveis são tóxicos em comparação aos condensados é ainda bastante difundida (Waghorn e McNabb, 2003).

Contudo, taninos hidrolisáveis de castanha e sumach apresentaram maior capacidade de diminuir a concentração de metano do que taninos condensados puros de mimosa e quebracho (6,56 e 7,5 vs 3,03 e 3,53%), respectivamente, em relação à dieta sem taninos (Jayanegara et al., 2015). Segundo os autores, tais diferenças entre os efeitos de taninos hidrolisáveis e condensados na concentração de metano não puderam ser claramente vistas a partir das diferenças nas populações de metanogênicos. Embora as populações de metanogênicas sejam similares, taninos hidrolisáveis e condensados podem afetar sua atividade de formas diferentes, o que pode explicar os efeitos.

2.4.2 Efeito das saponinas sobre a produção de CH₄

Tem sido relatado que as saponinas ou substâncias semelhantes a saponinas tem o potencial para alterar os padrões de fermentação ruminal, reduzindo a contagem de protozoários e suprimindo a emissão de metano (Hristov et al., 1999). Além disso, estudos indicam que as saponinas podem diminuir as atividades dos genes relacionados à produção de CH₄ ou a taxa de produção de CH₄ em cada célula metanogênica (Guo et al., 2008).

A atividade antimetanogênica das saponinas foi demonstrada tanto *in vitro* (Pen et al., 2006; Holtshausen et al., 2009) como *in vivo* (Wang et al., 2009; Holtshausen et al., 2009), principalmente com extratos ou material vegetal de *Yucca schidigera*, que é rica em saponinas esteroidais, e *Quillaja saponária*, que contém saponinas do tipo triterpenoide (Bodas et al., 2012).

As saponinas formam complexos com esteróis nas membranas das células protozoárias, o que confere a essas substâncias uma potente atividade antiprotozoária (Goel e Makkar, 2012). Os protozoários fornecem hidrogênio como substrato para a metanogênese conduzida pelos metanogênicos (Morgavi et al., 2010). Assim, as saponinas reduzem a produção de CH₄ via inibição de protozoários e, concomitantemente, dos metanogênicos simbióticos associados (Patra e Saxena, 2009a), que são responsáveis por uma proporção considerável do total de CH₄ produzido. Além disso, a capacidade de inibição de bactérias celulolíticas e fungos anaeróbios que degradam materiais fibrosos pelas saponinas (Wina et al., 2005) leva a uma diminuição

ainda maior do fornecimento de hidrogênio, o que, por sua vez, contribui para reduzir a emissão de CH₄ (Jayanegara et al., 2014).

Esta propriedade biológica das saponinas tem sido usada para implementar estratégias dietéticas de mitigação de CH₄ em ruminantes (Guyader et al., 2014), visto que cerca de 25% dos metanogênicos ruminais estão associados a protozoários e os últimos foram responsáveis por 10 a 25% da produção ruminal de CH₄ (Newbold et al., 1995). No entanto, foi mostrado por Dohme et al. (1999) que os efeitos de supressão de metano dos componentes ativos da ração do óleo de coco não eram necessariamente mediados pelo declínio na contagem de protozoários, mesmo quando ocorria uma supressão simultânea de protozoários.

Patra (2010) compilou informações de 16 experimentos que utilizaram diferentes tipos de saponinas, aplicando em seguida uma metanálise. Concluiu-se que, em média, as saponinas tendem a diminuir as emissões de metano e a concentração de protozoários no rúmen em 11 e 28%, respectivamente. No entanto, estes efeitos são muitas vezes inconsistentes e altamente afetados pelo tipo de saponinas testadas (Patra e Saxena, 2009a).

A adição de saponinas de chá (0,2 ou 0,4 mg/ml de TS) no fluido ruminal faunificado diminuiu a emissão de metano durante 24 h em 12,7% ou 14,0%, respectivamente. Contudo, o efeito sobre a produção de gás foi menor no fluido ruminal defaunado, sugerindo que a inibição da metanogênese pelas saponinas do chá foi principalmente devido à sua atividade antiprotozoária (Hu et al., 2005). Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Wang et al. (2000), que observaram uma redução de 15% na produção de CH₄ no tratamento adicionado com saponina de *Yucca* em comparação ao controle.

Guo et al. (2008) associaram o efeito da saponina de chá sobre a redução do CH₄ à inibição dos protozoários e presumivelmente à diminuição da atividade metanogênica dos metanogênicos associados aos protozoários. Mao et al. (2010) e Zhou et al. (2011) relataram uma diminuição significativa das emissões de CH₄ (g de TS/kg de IMS; -27 e -11%, respectivamente) e concentrações de protozoários (-42% em média, expressas como porcentagem do rDNA 16S bacteriano) em ovinos alimentados com 60% de forragem misturada com saponina em pó a 0,50% na MS.

Hess et al. (2003) observaram uma redução de 20% na produção de metano com a adição *in vitro* de saponinas de *Sapindus saponária*, e de cerca de 54% a contagem de protozoários, sem afetar, entretanto, as metanogênicas. Da mesma forma, Belanche et al. (2016) relataram uma redução de 22,68% na produção de metano quando incluíram 5% de saponinas da fruta da hera (IVY) na dieta de ruminantes. O efeito antimetanogênico de IVY se deu em função de uma modificação da estrutura da comunidade metanogênica e diminuiu sua diversidade. Este efeito

antimicrobiano específico do uso de IVY contra os metanogênicos foi considerado seu principal mecanismo antimetanogênico.

2.4.3 Efeito dos óleos essenciais sobre a produção de CH₄

Os óleos essenciais são misturas complexas de vários compostos individuais que apresentam potencial para melhorar a fermentação ruminal (Benchaar et al., 2007) e reduzir a produção de metano (Klevenhusen et al., 2012). Contudo, os efeitos dos óleos essenciais podem ser temporários e variáveis devido à capacidade de adaptação dos microrganismos do rúmen a essas substâncias (Klop et al., 2017) e à sua grande diversidade na natureza (Calsamiglia et al., 2007). Assim, é difícil estabelecer uma dosagem de óleo essencial na dieta que favoreça a manipulação da função ruminal (Wu et al., 2018), visto que essas substâncias contêm mais de 20 a 60 compostos ativos contendo uma variedade de moléculas voláteis, como os terpenos e terpenóides, componentes aromáticos derivados de fenol e componentes alifáticos, cada um dos quais tem um modo de ação diferenciado como antimicrobiano (Wu et al., 2017).

Assim, diferentes respostas têm sido obtidas ao se avaliar o efeito de óleos essenciais de plantas sobre a fermentação ruminal e a produção de CH₄. Chaves et al. (2008) mostraram que a atividade metanogênica das bactérias ruminais foi fortemente reduzida na presença de óleos essenciais, resultando numa diminuição acentuada na concentração de CH₄. Os autores verificaram que a incubação *in vitro* de 20 mg/L, de óleo de zimbro diminuiu em cerca de 49% a produção de CH₄ sem afetar, contudo, a produção total de AGCC ou a proporção molar individual desses ácidos.

Agarwal et al. (2009) relataram que a inclusão de óleo de hortelã-pimenta, nas concentrações 0,33, 1,0 e 2,0 µl/ml reduziu a emissão de CH₄ em 19,9%, 46,0% e 75,6%, respectivamente. Reduções maiores foram observadas quando se utilizou óleo de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) para avaliar a fermentação ruminal *in vitro*. Assim, Kumar et al. (2009) e Sallam et al. (2009) relataram uma diminuição de 56,0 e 90,3% na emissão de CH₄, ao utilizar óleo de eucalipto nas concentrações de 1,66 e 2,0 µl/ml de meio de incubação, respectivamente. O óleo de eucalipto é um óleo volátil destilado das folhas e galhos frescos no topo do eucalipto. Assim, provavelmente seu alto grau de insaturação causou um efeito tóxico nos metanogênicos (Prins et al., 1972), resultando assim, na forte diminuição na produção de CH₄.

De modo semelhante, a adição de níveis crescentes de óleo de laranja (*Citrus sinensis*) resultou numa diminuição linear na produção de CH₄ *in vitro*, chegando a -39,87% CH₄ emitido quando se adicionou 1200 mg do óleo/L (Kamalak et al., 2011). Contudo, alguns óleos essenciais não apresentaram nenhum efeito sobre a emissão de metano como o óleo de alho

(Klevenhusen et al., 2011), α CD-mentol, α CD-hortelã pimenta, α CD-tomilho (Tatsuoka et al., 2008), enquanto outros aumentaram em até 1,4 vezes a emissão de CH₄, como o α CD-cineole (Tatsuoka et al., 2008).

Essas diferenças nas respostas obtidas com o uso de diferentes tipos de óleos essenciais podem estar relacionadas à variação na composição desses produtos e à estabilidade de seu composto ativo. A dieta é outro fator que difere entre os estudos, já que dificilmente se utiliza as mesmas dietas experimentais.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A.T. What are feeds worth? Acritical evaluation of selected nutritive values methods. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 13., 2002, Gainesville. **Proceedings** Gainesville: University of Florida, p.33-47, 2002.
- AGARWAL, N.; SHEKHAR, C.; KUMAR, R. et al. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. **Animal Feed Science and Technology**, v.148, p.321-327, 2009.
- ALVAREZ NIVEA, D.M. (2000). **Evaluación *in vitro* de leguminosas tropicales como fuente de proteína para rumiantes**. Tesis Zootecnista. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, 140p.
- AMAROWICZ, R.; JANIAK, M. Hydrolysable Tannins. **Reference Module in Food Science**, p.1-7, 2018.
- ANKOM (2011). Disponível em: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf. Acesso em 07/01/2020.
- AZZAZ, H.H.; MURAD, H.A.; MORSY, T.A. Utility of Ionophores for Ruminant Animals: A Review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, p.254-265, 2015.
- BEAUCHEMIN K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; MCALLISTER, T.A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.48, p.21-27, 2008.
- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; MARTINEZ, T.F.; MCALLISTER, T.A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.85, p.1900-1906, 2007.
- BELANCHE, A.; PINLOCHE, E.; PRESKETT, D. et al. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and methanogenesis in the rumen simulation technique. **FEMS Microbiology Ecology**, v.92, p.1-13, 2016.
- BELANCHE, A.; RAMOS-MORALES, E.; NEWBOLD, C.J. *In vitro* screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.96, p.3069-3078, 2016.
- BENCHAAAR, C.; CHAVES, A.V.; FRASER, G.R. et al. Effects of essential oils and their components on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, v.87, p.413-419, 2007.
- BERARD, N.C.; WANG, Y.; WITTENBERG, K.M. et al. Condensed tannin concentrations found in vegetative and mature forage legumes grown in western Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, v.91, p.669-675, 2011.
- BEUVINK, J.M.W.; SPOELSTRA, S.F.; HOGENDORP, R.J. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuff incubated with buffered rumen fluid. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.40, p.401-407, 1992.

BHATTA, R.; ENISHI, O.; YABUMOTO, Y. et al. Methane reduction and energy partitioning in goats fed two concentrations of tannin from *Mimosa spp.* **Journal of Agricultural Science**, v.151, p.119-128, 2013.

BHATTA, R.; UYENO, Y.; TAJIMA, K. et al. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5512-5522, 2009.

BLUMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, p.109-119, 1993.

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.

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.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P.W. et al. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. **Journal of Animal Science**, v.90, p.2580-2595, 2007.

CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. 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.

CARRASCO, J.M.D.; CABRAL, C.; REDONDO, L.M. et al. Impact of chestnut and quebracho tannins on rumen microbiota of bovines. **BioMed Research International**, v.2017, p.1-11, 2017.

CARULLA, J.E.; KREUZER, M.; MACHMULLER, A.; HESS, H.D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.56, p.961-970, 2005.

CATTANI, M.; TAGLIAPIETRA, F.; MACCARANA, L. et al. Technical note: *in vitro* total gas and methane production measurements from closed or vented rumen batch culture systems. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.1736-1741, 2014.

CHALUPA, W. Manipulating rumen fermentation. **Journal of Animal Science**, v.46, p.585-599, 1977.

CHAVES, A.V.; HE, M.; YANG, W.Z. Effects of essential oils on proteolytic, deaminative and methanogenic activities of mixed ruminal bacteria. **Canadian Journal of Animal Science**, p.117-122, 2008.

CIESLAK, A.; ZMORA, P.; PERS-KAMCZYC, E. et al. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.102-106, 2012.

COBELLIS, G.; MARINUCCI, M.T.; YU, Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Science of the Total Environment**, v.545-546, p.556-568, 2016.

CONE, J.W.; BECKER, P.M. Fermentation kinetics and production of volatile fatty acids and microbial protein by starchy feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.172, p.34-41, 2012.

CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VISSCHER, G.J.W.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, p.113-128, 1996.

CZERKAWSKI, J. W.; AND BRECKENRIDGE, G. Small scale apparatus for studying rumen fermentation *in vitro*. **Lab. Practice**, v.19, p.717-719, 1970.

DAVIES, D.R.; THEODOROU, M.K.; BAUGHAN, J. et al. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. **Ann. Zootech**, v.44, suppl. p.36, 1995.

DAVIES, Z.S.; MASON, D.; BROOKS, A.E. et al. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, p.205-221, 2000.

DOHME, F.; MACHMULLER, A.; ESTERMANN, B.L. et al. The role of the rumen ciliate protozoa for methane suppression caused by coconut oil. **Letters of Applied Microbiology**, v.29, p.187-192, 1999.

DUIN, E.C.; WAGNER, T.; SHIM, S. et al. Mode of action uncovered for the specific reduction of methane emissions from ruminants by the small molecule 3-nitrooxypropanol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, p.1-6, 2016.

ELLIS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E. et al. Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. **Journal of Agricultural Science**, v.146, p.213-233, 2008.

GETACHEW, G.; BLUMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.261-281, 1998.

GETACHEW, G.; DePETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; FADEL, J.G. Use of an *in vitro* rumen gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.547-559, 2005.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, v.44, p.729-739, 2012.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, DC: USDA, (Agricultural Handbook, 379), 1970.

GOSSELINK, J.M.J.; DULPHY, J.P.; PONCET, C. et al. Prediction of forage digestibility in ruminants using *in situ* and *in vitro* techniques. **Animal Feed Science and Technology**, v.115, p.227-246, 2004.

GRANT, R.J.; MERTENS, D.R. Impact of *in vitro* fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.1263-1272, 1992.

GROSSE BRINKHAUS, A.; BEE, G.; SILACCI, P. et al. Effect of exchanging *Onobrychis viciifolia* and *Lotus corniculatus* for *Medicago sativa* on ruminal fermentation and nitrogen turnover in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.1-14, 2016.

GUÇLU-USTUNDAG, O.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, p.231-258, 2007.

GUO, Y.Q.; LIU, J.X.; LU, Y. et al. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen microorganisms. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, p.421-426, 2008.

GUYADER, J.; EUGÈNE, M.; NOZIÈRE, P. et al. Influence of rumen protozoa on methane emissions in ruminants: a meta-analysis approach. **Animal**, v.8, p.1816-1825, 2014.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v.68, p.2831-2846, 2007.

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

HESS, H.D.; MONSALVE, L.M.; LASCANO, C.E. et al. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.54, p.703-713, 2003.

HOLTER, J.B.; YOUNG, A.J. Methane production in dry and lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2165-2175, 1992.

HOLTSHAUSEN, L.; CHAVES, A.V.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja Saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Animal Science**, v.92, p.2809-2821, 2009.

HRISTOV, A.N.; IVAN, M.; NEILL, L.; MCALLISTER, T.A. Evaluation of several potential bioactive agents for reducing protozoal activity *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.105, p.163-184, 2003.

HRISTOV, A.N.; MCALLISTER, T.A.; HERK, F.H.V. Effect of *Yucca schidigera* on ruminal fermentation and nutrient digestion in heifers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2554-2563, 1999.

HU, W.L.; LIU, J.X.; YE, J.A. et al. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.120, p.333-339, 2005.

HU, W.L.; WU, Y.M.; LIU, J.X. et al. Tea saponins affect *in vitro* fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. **Journal of Zhejiang University Science**, v.8, p.787-792, 2005.

HUANG, Q.; LIU, X.; ZHAO, G. et al. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. **Animal Nutrition**, v.3, p.1-14, 2017.

JAYANEGARA, A.; GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.209, p.60-68, 2015.

JAYANEGARA, A.; WINA, E.; TAKAHASHI, J. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: influence of addition levels and plant sources. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.27, p.1426-1435, 2014.

JONES, W.T.; BROADHURST, R.B.; LYTTLETON, J.W. Condensed tannins of pasture legume species. **Phytochemistry**, v.15, p.1407-1409, 1976.

KAMALAK, A.; ATALAY, A.I.; OZKAN, C.O. et al. Effect of essential orange (*Citrus sinensis* L.) oil on rumen microbial fermentation using *in vitro* gas production technique. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v.21, p.764-769, 2011.

KANG, J.; ZENG, B.; TANG, S. et al. Effects of *Momordica charantia* saponins on *in vitro* ruminal fermentation and microbial population. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.29, p.500-508, 2016.

KIM, W.Y.; HANIGAN, M.D.; LEE, S.J. et al. Effects of *Cordyceps militaris* on the growth of rumen microorganisms and *in vitro* rumen fermentation with respect to methane emissions. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.7065-7075, 2014.

KLEVENHUSEN F.; MURO-REYES, A.; KHIAOSA-ARD, R. et al. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on *in vitro* ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.61-69, 2012.

KLEVENHUSEN, F.; ZEITZ, J.O.; DUVAL, S. et al. Garlic oil and its principal component diallyl disulfide fail to mitigate methane but improve digestibility in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, p.356-363, 2011.

KLOP, G.; DIJKSTRA, J.; DIEHO, K. et al. Enteric methane production in lactating dairy cows with continuous feeding of essential oils or rotational feeding of essential oils and lauric acid. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1-13, 2017.

KRISHNAMOORTHY, U.; RYMER, C.; ROBINSON, P.H. The *in vitro* gas production technique: Limitations and opportunities. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.1-7, 2005.

KUMAR, R.; KAMRA, D.N.; AGRAWAL, N.; CHAUDHARY, L.C. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. **Animal Nutrition and Feed Technology**, v.9, p.237-243, 2009.

KY, I.; LE FLOCH, A.; ZENG, L. et al. Tannins. **Encyclopedia of Food and Health**, p.247-255, 2016.

LATTANZIO, V. 2013. **Phenolic compounds: Introduction**. In: K.G. RAMAWAT, J.-M. Mérillon (Eds). *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (p.1543-1580). Berlin Heidelberg: Springer.

LI, Y.; IWAASAA, D.; WANG, Y. et al. Condensed tannins concentration of selected prairie legume forages as affected by phenological stages during two consecutive growth seasons in western Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, v.94, p.817-826, 2014.

LILA, Z.A.; MOHAMMED, N.; KANDA, S. et al. Effect of sarsaponin on rumen fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.3330-3336, 2003.

LIU, J.Y.; YUAN, W.Z.; YE, J.; WU, Y. Effect of tea (*Camellia sinensis*) saponin addition on rumen fermentation *in vitro*. In: CAMACHO, J.H.; CASTRO, C.A.S. (Eds) *Matching herbivore nutrition to ecosystems biodiversity. Tropical and subtropical agrosystems. Proceedings of the Sixth International Symposium on the Nutrition of Herbivore*; Merida, Mexico, v.3, p.561-564, 2003.

MABJEESH, S.J.; COHEN, M.; ARIELI, A. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2289-2294, 2000.

MAKKAR, H.P.S.; BLUMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone or polyethylene glycol with tannins and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, v.73, p.897-913, 1995.

MAO, H.L.; WANG, J.K.; ZHOU, Y.Y. et al. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. **Livestock Science**, v.129, p.56-62, 2010.

MARION, G. (2016). **Bioactive compounds in forage legumes: Structural changes during conservation, their fate along the digestive tract and their potential to impact ruminant products**. ETH Zurich, 153p. (Thesis).

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semiautomated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuffs evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.

McBEE, R.H. Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose. **Applied Microbiology**, v.1, p.106-110, 1953.

McDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.D. et al. **Animal nutrition**. 5.ed. New York: Longman, 1995. 607p.

MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **The Journal of Agricultural Science, Cambridge**, v.88, p.645-650, 1977.

MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.93, p.217-222, 1979.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, v.28, p.7-55, 1988.

MIN, B.R.; BARRY, T.N.; ATTWOOD, G.T.; McNABB, W.C. 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.

MORGAVI, D.P.; FORANO, E.; MARTIN, C.; NEWBOLD, C.J. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, p.1024-1036, 2010.

MOSS, A.R.; JOUANY, J.P.; NEWBOLD, C.J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annals of Biotechnology**, v.49, p.231-235, 2000.

MOULD, F.L.; KLIEM, K.E.; MORGAN, R.; MAURICIO, R.M. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.31-50, 2005.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.2010-2037, 2006.

NEWBOLD, C.J.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, p.230-234, 1995.

NIEMETZ, R.; GROSS, G.G. Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. **Phytochemistry**, v.66, p.2001-2011, 2005.

ORNAGHI, M.G.; PASSETTI, R.A.C.; TORRECILHAS, J.A. Essential oils in the diet of young bulls: Effect on animal performance, digestibility, temperament, feeding behavior and carcass characteristics. **Animal Feed Science and Technology**, v.234, p.274-283, 2017.

ØRSKOV, E.R.; REID, G.W.; KAY, M. Prediction of intake of cattle from degradation characteristics of roughages. **Animal Production**, v.46, p.29-34, 1988.

PATRA, A.K. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.90, p.2700-2708, 2010.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v.71, p.1198-1222, 2010.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.363-375, 2009b.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.24-37, 2011.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. The effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutrition Research Reviews**, v.22, p.204-219, 2009a.

PATRA, A.K.; STIVERSON, J.; YU, Z. et al. Effects of quillaja and yucca saponins on communities and select populations of rumen bacteria and archaea, and fermentation *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v.113, p.1329-1340, 2012.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.

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.

PEN, B.; SAR, C.; MWENYA, B. et al. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, p.175-186, 2006.

PRINS, R.A.; VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.38, p.281-287, 1972.

PUCHALA, R.; MIN, B.R.; GOETSCH, A.L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v.83, p.182-186, 2005.

RAMOS-MORALES, E.; DE LA FUENTE, G.; DUVAL, S. et al. Antiprotozoal effect of saponins in the rumen can be enhanced by chemical modifications in their structure. **Frontiers in Microbiology**, v.8, p.1-13, 2017.

RAMOS-MORALES, E.; DE LA FUENTE, G.; NASH, R.J. et al. Improving the antiprotozoal effect of saponins in the rumen by combination with glycosidase inhibiting iminosugars or by modification of their chemical structure. **Plos One**, v.12, p.1-14, 2017b.

RIRA, M.; CHENTLI, A.; BOUFENERA, S.; BOUSSEBOU, H. Effects of plants containing secondary metabolites on ruminal methanogenesis of sheep *in vitro*. **Energy Procedia**, v.74, p.15-24, 2015.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.9-30, 2005.

SALLAM, S.M.A.; BUENO, I.C.S.; BRIGIDE, P. et al. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. **Options Méditerranéennes**, n.85, p.267-272, 2009.

SANTOS, G.T.; ASSIS, M.A.; GONÇALVES, G.D. et al. Determinação da digestibilidade *in vitro* de gramíneas do gênero *Cynodon* com uso de diferentes metodologias. **Acta Scientiarum**, v.22, p.761-764, 2000.

SAVAGE, G.P. **Saponins**. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P.; TOLDRÁ, F. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, 2003.

SEN, S.; MAKKAR, H.P.S.; MUETZEL, S., BECKER, K.; 1998. Effect of *Quillaja saponaria* and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.35-38, 1998.

SHAHAT, A.A.; MARZOUK, M.S. Tannins and related compounds from medicinal plants of Africa. **Medicinal Plant Research in Africa**, p.479-555, 2013.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

SILVA, T.E.; DETMANN, E.; CAMACHO, L.F. et al. Comparação de métodos *in vitro* para a quantificação da digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro de forragens e concentrados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.69, p.1635-1644, 2017.

SILVEIRA, M.F.; KOZLOSKI, G.V.; MESQUITA, F.R. et al. Avaliação de métodos laboratoriais para estimar a digestibilidade e o valor energético de dietas para ruminantes. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.2, p.429-437, 2009.

SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; TROMBETTA, D. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v.174, p.1244-1262, 2017.

SPANGHERO, M.; ZANFIA, C.; FABBRO, E. ET AL. Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.364-374, 2008.

STAFFORD, H.A. Flavonoid evolution: An enzymatic approach. **Plant Physiology**, v.96, p.680-685, 1991.

STORM, I.M.L.D.; HELLWING, A.L.; NIELSEN, N.I.; MADSEN, J. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. **Animals**, v.2, p.160-183, 2012.

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.

TATSUOKA, N.; HARA, K.; MIKUNI, K. et al. Effects of the essential oil cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. **Animal Science Journal**, v.79, p.68-75, 2008.

THEODORIDOU, K.; AUFRÈRE, J.; ANDUEZA, D. et al. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.160, p.23-38, 2010.

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, p.185-197, 1994.

THEODOROU, M.K.; LOWMAN, R.S.; DAVIES, Z.S. et al. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. Occasional Publication. **British Society of Animal Science**, v.22, p.55-64, 1988.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v.18, p.104-109, 1963.

UNGERFELD, E.M. Inhibition of rumen methanogenesis and ruminant productivity: a meta-analysis. **Frontiers in Veterinary Science**, v.5, p.1-13, 2018.

VAN SOEST, P.J. (1994). **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476 p.

VENEMAN, J.B.; SAETNAN, E.R.; CLARE, A.J.; NEWBOLD, C.J. MitiGate; an online meta-analysis database for quantification of mitigation strategies for enteric methane emissions. **Science of the Total Environment**, v.572, p.1166–1174, 2016.

WAGHORN, G.C.; MCNABB, W.C. Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.62, p.383-392, 2003.

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

WALLACE, R.J.; MCEWAN, N.R.; MCINTOSH, F.M. et al. Natural products as manipulators of rumen fermentation. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.15, p.1458-1468, 2002.

WANAPAT, M.; KANG, S.; POLYORACH, S. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.4, p.1-11, 2013.

WANG, C.J.; WANG, S.P.; ZHOU, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.148, p.157-166, 2009.

WANG, Y.X.; MCALLISTER, T.A.; YANKE, L.J. et al. *In vitro* effects of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on rumen microbial protein synthesis and ruminal fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.2114-2122, 2000.

WEIMER, P.J. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1-16, 2015.

WILKINS, J. Pressure transducer method for measuring gas production by microorganisms. **Applied Microbiology**, v.27, p.135-140, 1974.

WILLIAMS, B.A. (2000). **Cumulative gas-production techniques for forage evaluation**. In: GIVENS, D.I.; OWEN, E.; AXFORD, R.F.E.; OMED, H.M. Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CAB International, Wallingford, UK, p.189-213.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production – A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.8093-8105, 2005.

WU, F.F.; JIN, Y.M.; XU, X.M.; YANG, N. Electrofluidic pretreatment for enhancing essential oil extraction from citrus fruit peel waste. **Journal of Cleaner Production**, v.159, p.85-94, 2017.

WU, P.; LIU, Z.B.; HE, W.F. et al. Intermittent feeding of citrus essential oils as a potential strategy to decrease methane production by reducing microbial adaptation. **Journal of Cleaner Production**, v.194, p.704-713, 2018.

YÁNEZ-RUIZ, D.R.; BANNINK A.; DIJKSTRA, J. et al. Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants - a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.216, p.1-18, 2016.

ZHOU, Y.Y.; MAO, H.L.; JIANG, F.J. et al. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.166-167, p.93-100, 2011.

CAPÍTULO II

Técnicas de produção de gás *in vitro* como preditoras do valor nutricional de dietas para ruminantes

RESUMO

O objetivo com o presente estudo foi comparar os perfis de produção de gás e degradabilidade dos nutrientes de duas dietas utilizando duas técnicas de produção de gás *in vitro*, automática e semiautomática. Foi adotado o delineamento experimental em blocos casualizados em arranjo fatorial 2×2 , sendo duas dietas com diferentes proporções de carboidratos não fibrosos (CNF), (baixo CNF vs alto CNF) e duas técnicas de produção de gás (automática vs semiautomática), com quatro repetições, sendo os blocos representados por três ensaios diferentes. A produção de gás oriunda da fermentação dos carboidratos fibrosos (Vf_2) foi 22% maior na técnica automática em relação à semiautomática. Houve interação para a estimativa da produção total de gás (V_t) às 72 horas de incubação ($P = 0,034$). O V_t da dieta com alto CNF foi maior, independente da técnica utilizada, com valor médio de 198,33 ml de gás/g MS. Contudo, o V_t da dieta com baixo CNF diferiu entre técnicas, sendo 22,9% maior na técnica automática. O Vf_1 apresentou correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,94$) entre as duas técnicas com alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,87$), enquanto para o Vf_2 foi observada correlação positiva forte ($r = 0,702$), contudo o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,47$). A curva de produção de gás cumulativa após 14 horas de incubação foi maior na técnica automática, produzindo cerca de 6,3% mais gases às 48 horas de incubação em relação a semiautomática. No diagrama de dispersão foi observada correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,96$) entre as técnicas, com alto ajuste entre as técnicas pelo coeficiente de determinação $R^2 = 0,93$. Houve maior degradabilidade da matéria seca (MS) (+ 3,8%), matéria orgânica (MO) (+ 3,3%). Em ambas as dietas, a degradabilidade da proteína bruta (PB) foi maior na técnica semiautomática ($P < 0,0001$). A dieta de alto CNF resultou em menor pH e menor N-NH₃ no meio de incubação, comparado à de baixo CNF, enquanto a degradabilidade da MS, MO e PB aumentou. As técnicas de produção de gás automática e semiautomática, estimaram de modo semelhante os parâmetros cinéticos e os perfis de produção de gás total, demonstrando o potencial de ambas técnicas para avaliação do valor nutricional de dietas com diferentes proporções de CNF.

Palavras – chave: Cinética de fermentação. Degradabilidade. Rúmen

ABSTRACT

The aim of this study was to compare the gas production profiles and nutrient degradability of two diets using two *in vitro* gas production techniques, automatic and semi-automatic technique. A randomized block design in a 2×2 factorial arrangement was adopted, with two diets with different proportions of non-fibrous carbohydrates (NFC), (low NFC vs high NFC), and two gas production techniques (automatic vs semi-automatic), with four replicates. The blocks represented three *in vitro* runs. Gas production from the fermentation of fibrous carbohydrates (V_f2) was 22% higher in the automatic technique compared to the semiautomatic. There was interaction for the estimation of the total gas production (V_t) at 72 hours of incubation ($P = 0.034$). The V_t of the high NFC diet was higher, regardless of the technique used, with an average value of 198.33 ml of gas g DM. However, the V_t of the diet with low NFC differed between techniques, with 22.9% higher in the automatic technique. The V_f1 showed a positive correlation of high magnitude ($r = 0.94$) between the two techniques with a high coefficient of determination ($R^2 = 0.87$), while for V_f2 a strong positive correlation was observed ($r = 0.702$), however the coefficient of determination ($R^2 = 0.47$). Cumulative gas production curve after 14 hours of incubation was greater in the automatic technique, producing about 6.3% more gases at 48 hours of incubation compared to semiautomatic. In the dispersion diagram, a positive correlation of high magnitude ($r = 0.96$) was observed between the techniques, with a high adjustment between the techniques by the coefficient of determination ($R^2 = 0.93$). There was greater degradability of dry matter (DM) (+ 3.8%), organic matter (OM) (+ 3.3%). In both diets, the degradability of crude protein (CP) was greater in the semiautomatic technique ($P < 0.0001$). The high NFC diet resulted in lower pH and lower N-NH₃ in the incubation medium, compared to the low NFC diet, while the degradability of DM, OM and CP increased. The automatic and semi-automatic techniques estimated the kinetic parameters and the profiles of total gas production similarly, demonstrating the potential of both techniques for assessing the nutritional value of diets with different proportions of NFC.

Key words: Degradability. Fermentation kinetics. Rumen

1 INTRODUÇÃO

A técnica de produção de gás tornou-se uma ferramenta comum para caracterizar alimentos e investigar a cinética da fermentação ruminal. Desde o primeiro relato da técnica realizado por Menke et al. em 1979, várias novas técnicas foram desenvolvidas para mensurar a produção de gás durante a fermentação de um alimento (Pell e Schofield, 1993; Theodorou et al., 1994; Cone et al., 1996; Davies et al., 2000). Essas técnicas têm como princípio, medir eletronicamente a produção de gás durante a incubação de uma amostra de alimento com líquido ruminal.

A padronização do protocolo de avaliação de alimentos é uma premissa importante a ser considerada, tendo sido fundamental no desenvolvimento da técnica de Tilley e Terry (1963), permitindo resultados reproduzíveis entre laboratórios. Atualmente, a composição do meio, o tempo de incubação e o método de coleta do líquido ruminal dos animais doadores foram padronizados. Contudo, os protocolos variam entre diferentes laboratórios que utilizam as técnicas de produção de gás. Além disso, a própria técnica varia entre laboratórios, principalmente no que diz respeito ao uso da técnica semiautomática ou automática.

A técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases (Maurício et al., 1999), tem sido muito utilizada para predizer o valor nutricional de alimentos e dietas (Jayme et al., 2009; Zhong et al. 2016; Lagrange et al., 2019), devido principalmente à capacidade de avaliar muitos alimentos, possuir baixo custo e alta repetibilidade, além de oferecer a possibilidade de descrição da cinética da fermentação ruminal, estimando a taxa e a extensão da degradação. Contudo, ainda depende da inserção manual de um transdutor de pressão portátil em cada frasco de fermentação, elevando a necessidade de mão de obra.

Por sua vez, as técnicas de produção totalmente automatizadas, sejam elas ventiladas (Davies et al., 2000) ou sem ventilação (Pell e Schofield, 1993), apresentam a vantagem de necessitar de menos mão de obra nos estudos de produção de gás. Entretanto, apesar de suas vantagens na avaliação de alimentos, os sistemas totalmente automatizados apresentam um elevado custo inicial, e sua complexidade e as dificuldades de manutenção tornam estes sistemas inadequados para muitos laboratórios.

Assim, foi avaliado a cinética de produção de gases a partir da fermentação ruminal em duas dietas distintas, utilizando duas técnicas de produção de gás *in vitro*: a técnica semiautomática proposta por Mauricio et al. (1999) e a técnica totalmente automatizada desenvolvida pela ANKOM (ANKOM^{RF} Gas Production System).

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na unidade de Produção de Gás do Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal - LAANA, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias – CCA, da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Areia-PB.

O estudo foi realizado de acordo com os critérios relativos aos cuidados com animais experimentais, sendo o uso de animais fistulados no rúmen submetido ao comitê de ética e bem-estar animal da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (CEUA nº 9866190719).

2.1 DIETAS EXPERIMENTAIS

Para realização do ensaio, foram utilizados como substrato, duas dietas à base de feno de tifton, milho moído e farelo de soja, com diferentes relações volumoso: concentrado, 60:40 (baixo carboidrato não fibroso) e 30:70 (alto carboidrato não fibroso) com base na MS (Tabela 1). Todos os ingredientes foram moídos em moinho de facas tipo Willey (Modelo MA 580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil), utilizando peneiras de crivo de 1,0 mm. A composição química dos alimentos e de ambas as dietas foram estimadas seguindo os métodos da AOAC (2005) (Tabela 1). Foram realizadas análises de matéria seca (MS) (*método 934.01*), matéria mineral (MM) (*método 942.05*), proteína bruta (PB) (Kjeldahl, *método 954.01*) e extrato etéreo (EE) (*método 920.39*). A fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram estimadas pelo método de Van Soest et al. (1991), utilizando analisador de fibra da ANKOM (ANKOM²⁰⁰ Fibre Analyzer – ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA). Os carboidratos totais (CT) foram estimados por meio da equação proposta por Sniffen et al. (1992), $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ e os carboidratos não-fibrosos (CNF) segundo Van Soest et al. (1991), $CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)$.

Tabela 1 – Composição química dos ingredientes e das rações experimentais

Ingredientes	Composição química (g/kg MS)							
	MS ¹	MM ²	PB ³	EE ⁴	FDN ⁵	FDA ⁶	CT ⁷	CNF ⁸
<i>Feno de tifton</i>	926,0	98,5	97,2	17,6	781,0	428,5	786,7	5,7
<i>Milho moído</i>	883,9	22,3	103,0	43,3	176,6	44,9	831,4	654,8
<i>Farelo de soja</i>	893,9	63,7	480,9	13,5	153,3	86,9	441,9	288,6
Dietas experimentais								
<i>Dieta Baixo CNF</i>	910,7	75,3	160,7	25,5	580,4	304,8	812,5	158,1
<i>Dieta Alto CNF</i>	899,0	52,0	158,8	34,9	387,6	180,7	845,2	366,7
	Proporção dos ingredientes da dieta (g/kg MS)							
	Feno de tifton		Milho moído			Farelo de Soja		
<i>Dieta Baixo CNF⁸</i>	608,0		230,0			162,0		
<i>Dieta Alto CNF⁸</i>	307,0		540,0			152,0		

¹Matéria Seca, ²Matéria Mineral, ³Proteína Bruta, ⁴Extrato Etéreo, ⁵Fibra em Detergente Neutro, ⁶Fibra em Detergente Ácido, ⁷Carboidratos Totais, ⁸Carboidratos Não Fibrosos.

2.2 TÉCNICAS DE PRODUÇÃO DE GÁS

Para avaliação da cinética de produção de gás, foram utilizadas duas técnicas distintas, semiautomática (Mauricio et al., 1999) e automática (ANKOM^{RF} System).

No sistema semiautomático, a cinética de produção de gás foi avaliada através da metodologia proposta por Mauricio et al. (1999) e modificada por Menezes et al. (2015). A pressão nos frascos foi medida por um transdutor de pressão (DPI 705, Druck Ltda., General Electrics®; Leicester, UK) (Figura 1-B). As leituras de pressão foram tomadas em uma frequência maior durante o período inicial de fermentação. A produção de gás foi registrada às 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34 e 48 horas. Foi realizada agitação manual dos frascos após cada leitura de pressão. A pressão de gás (*psi*) medida durante o ensaio foi transformada em volume (ml de gás) pela equação: $V = (4,4392 \times p) + 0,8943$.

Na técnica de produção de gás automática, foi utilizada a metodologia desenvolvida pela Ankom Technology® (ANKOM^{RF} Gas Production System) (Ankom, 2011) (Figura 1-A). A técnica possibilita avaliar a cinética da fermentação ruminal de forma automatizada, realizando o monitoramento da pressão do gás dentro de múltiplos módulos. O sistema tem capacidade para incluir até 50 módulos individuais que comunicam informações a um computador usando transmissão de radiofrequência (RF). Cada unidade (módulo) consiste em uma garrafa de vidro (capacidade real: 310 ml) equipada com um módulo sensor de pressão ANKOM (faixa de pressão: – 69 a + 3447 kPa; resolução: 0,27 kPa; precisão 0,1% dos valores medidos), incluindo um microchip e um remetente de rádio. O sistema foi ajustado para registrar a produção de gás nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34 e 48 horas, conforme a técnica semiautomática. Foi realizada agitação manual dos frascos nesses mesmos horários. A pressão

do gás medida foi convertida em mols de gás produzido, usando a lei do gás 'ideal' (equação 1) e depois convertida em mililitros (ml) de gás produzido pela lei de Avogadro (equação 2).

$$n = p (V / RT) \quad (\text{equação 1})$$

Onde: n = gás produzido em moles (mol)

p = pressão em kilopascal (kPa)

V = volume do head-space no frasco de vidro em litros (L)

T = temperatura em Kelvin (K)

R = constante do gás ($8,314472 \text{ L}\cdot\text{kPa}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)

$$\text{Gás produzido em ml} = n \times 22.4 \times 1000 \quad (\text{equação 2})$$

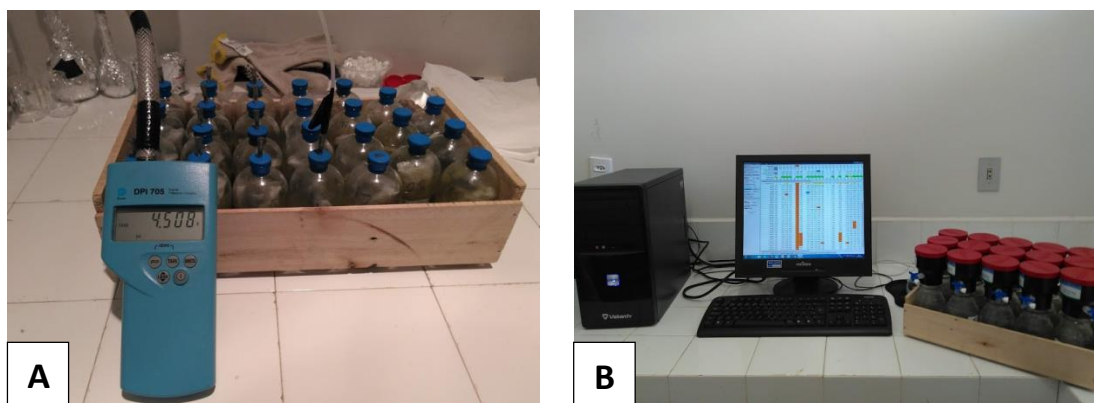


Figura 1 – (A) Sistema semiautomático de produção de gás; (B) Sistema automático de produção de gás.

2.3 DEGRADAÇÃO E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO*

2.3.1 Animais doadores

O líquido ruminal utilizado como inoculante nos ensaios de produção de gás foi obtido de dois ovinos Santa Inês (40 ± 3 kg de peso vivo), com fístula ruminal. Os animais foram alimentados com uma dieta à base de capim elefante e suplementados diariamente com 0,4 kg de concentrado, composto por milho moído, farelo de soja e suplemento mineral, além de água de bebida *ad libitum*.

2.3.2 Preparação do inóculo microbiano

O líquido ruminal foi coletado de diferentes partes do rúmen, com o auxílio de conchas de inox, posteriormente filtrado através de quatro camadas de gaze, armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e encaminhados ao laboratório. O líquido coletado dos

dois animais doadores foi misturado em proporções iguais, sendo continuamente purgados com CO₂, para manter as condições de anaerobiose.

2.3.3 Preparo do meio de incubação

O meio de incubação foi preparado misturando-se 500 ml de água destilada, 0,1 ml da solução de microminerais, 200 ml da solução buffer e 200 ml da solução de macrominerais (Theodorou et al., 1994). Não foi adicionado “resazurina” na solução redutora. Uma corrente de CO₂ foi borbulhada no meio de incubação por pelo menos 3 horas antes do uso. Os reagentes utilizados para o preparo do meio e suas proporções são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Composição das soluções usadas para preparar o meio de incubação, conforme descrito por Theodorou et al. (1994).

Solução	
<i>Buffer</i>	(g/l)
NH ₄ HCO ₃	4,0
NaHCO ₃	35,0
<i>Macrominerais</i>	(g/l)
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9,45
KH ₂ PO ₄	6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
<i>Microminerais</i>	(g/100 ml)
CaCl ₂ .2H ₂ O	13,2
MnCl ₂ .4H ₂ O	10,0
CoCl ₂ .6H ₂ O	1,0
FeCl ₂ .6H ₂ O	8,0
<i>Agente redutor</i>	
Cisteína HCL.1H ₂ O	0,625 g
Na ₂ S.7H ₂ O	0,625 g
1M NaOH	4 ml
Água destilada	95 ml

2.3.4 Preparo dos frascos de incubação

Os ingredientes das rações foram moídos (gramatura = 1 mm) e pesados separadamente em sacos de náilon (5 x 10 cm), com poro de 50 µm, (1g de ração/saco), que foram colocados em frascos de vidro de 160 ml (técnica semiautomática) e em frascos de borossilicato de 250 ml (técnica automática). Adicionou-se em cada frasco 90 ml do meio de incubação (Theodorou et al., 1994), previamente preparado. Em seguida, a solução dos frascos, de ambas as técnicas, foi saturada com CO₂. Os frascos do sistema semiautomático foram selados com tampas de

borracha, acondicionados em caixas de madeira e mantidos, durante a noite, sob refrigeração a 4°C. Por sua vez, os frascos do sistema automático foram fechados com tampa rosqueada, colocados em caixas de madeira e mantidos, sob refrigeração a 4°C (Fig. 1A).

Cinco horas antes do início do ensaio, as caixas contendo os frascos de incubação foram transferidas para a estufa de produção de gás (Fig. 1B), mantida à temperatura de 39°C, para garantir que a solução tampão estivesse na mesma temperatura no momento da inoculação do líquido ruminal.

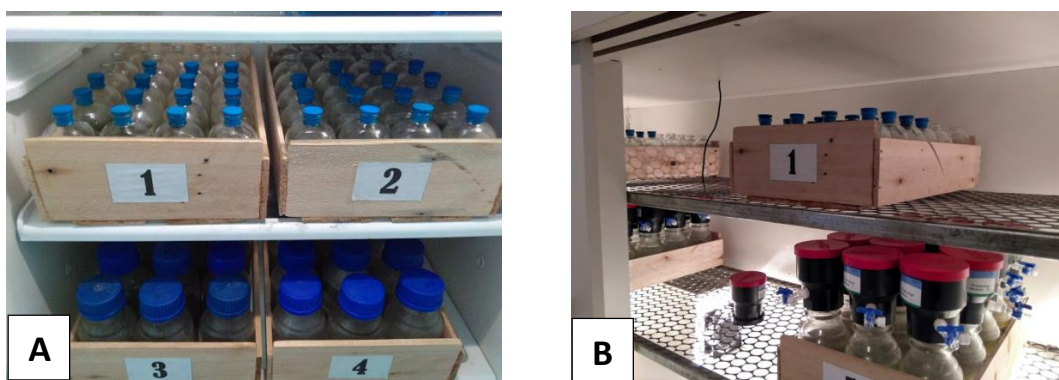


Figura 2 – (A) Frascos de incubação mantidos sob refrigeração após serem selados com a tampa; (B) Frascos transferidos para estufa de produção de gás antes da adição do líquido ruminal.

No sistema semiautomático, o líquido ruminal (10 ml) foi injetado nos frascos de incubação através da tampa de borracha, utilizando uma seringa de 20 ml com uma agulha hipodérmica de 18G x 1½ (40 mm x 1,20 mm) (Lagrange et al., 2019). Logo em seguida a pressão interna dos frascos foi eliminada, e estes transferidos para a estufa, registrando-se o início da incubação.

No sistema automático a injeção do líquido foi feita diretamente através da parte superior dos frascos. Assim, retirou-se as tampas rosqueadas dos frascos, adicionou-se 10 ml de líquido ruminal, saturou a solução com CO₂ e em seguida os frascos foram fechados com o módulo. Posteriormente, todas as válvulas dos módulos foram abertas para liberar a pressão existente e logo em seguida fechadas, dando início ao ensaio.

2.3.5 Cinética de produção de gás e degradabilidade dos nutrientes

A produção cumulativa de gás foi analisada pelo modelo logístico bicompartimental (Schofield et al., 1994):

$$V_t = \frac{Vf_1}{1 + e^{2-4m_1(T-L)}} + \frac{Vf_2}{1 + e^{2-4m_2(T-L)}}$$

Onde: V_t – volume máximo total de produção de gás, V_{f1} – volume máximo de gás para a fração de rápida degradação (carboidratos não fibrosos – CNF), V_{f2} – volume máximo de gás para a fração de degradação lenta (carboidratos fibrosos – CF), m_1 – taxa de produção de gás para a fração de rápida degradação, m_2 – taxa de produção de gás para a fração de degradação lenta, L – tempo de colonização (fase *lag*) e T – tempo de fermentação.

Para que os dados de produção de gás se ajustassem ao modelo matemático testado, foi necessário estimar a produção de gás às 72 horas, através da aplicação de uma derivada, utilizando o modelo exponencial.

A degradabilidade da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta das dietas foram estimadas pela remoção dos sacos de poliéster após 48 horas de incubação. A remoção se deu após os frascos terem sido refrigerados a 4 °C para cessar a fermentação microbiana. Em seguida, os sacos foram lavados em água corrente e pesados após secagem por 12 horas em estufa de 65 °C e 2 horas em estufa de 105 °C.

2.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

Para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal, foram feitas coletas do líquido de incubação nos frascos de fermentação. O líquido foi homogeneizado e o pH mensurado por meio da leitura direta utilizando potenciômetro digital portátil (K39-0014PA – KASVI - Brasil). Posteriormente, cerca de 40 ml do meio sem ácido foi armazenado para mensuração do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), conforme técnica descrita por Detmann et al. (2012) (INCT - CA N-007/1) onde, no momento da análise, as amostras foram descongeladas, acrescidas de ácido tricloroacético e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos.

2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para realização do estudo, foi adotado o delineamento em blocos casualizados, em arranjo fatorial 2 x 2 (Duas técnicas x duas dietas experimentais). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento / por ensaio, sendo realizado um total de três ensaios, que foram utilizados como blocos, utilizando o modelo geral:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + D_j + TD_{ij} + B_k + e_{ijkl}$$

Onde, Y_{ijkl} = valor observado; μ = média geral do experimento; T_i = efeito fixo da técnica de produção de gás (i = automática e semiautomática); D_j = Efeito fixo da dieta (j = dieta 1 e 2); TD_{ij} =efeito da interação “técnica × dieta”; B_k =efeito fixo do bloco (k = ensaio 1, 2 e 3); e_{ijkl} = erro experimental aleatório.

A estimativa dos parâmetros do modelo de produção de gás e o ajuste das curvas foram realizados utilizando o procedimento para modelos não lineares (PROC NLIN) do software estatístico SAS versão 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento do modelo linear misto (PROC MIXED) do SAS. As médias dos tratamentos foram comparadas aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados referentes as duas técnicas de produção de gás nas dietas de alta e baixa teor de CNF foram submetidas a análise multivariada, através da medida de dissimilaridade, utilizado a distância de Gower e como método de agrupamento *Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average* (UPGMA), utilizando o programa MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets (Kumar, Stecher e Tamura, 2015), para elaboração do cluster a partir da matriz de dissimilaridade. A análise de componentes principais (PC) também foi realizada para identificar as variáveis que mais contribuíram para o comportamento dos tratamentos utilizando o programa R (R Development Core Team, 2020), pacote factoextra.

3 RESULTADOS

A produção de gás oriunda da fermentação dos carboidratos fibrosos (Vf_2), estimada até as 72 horas de incubação, foi 22% maior na técnica automática em relação à semiautomática. No entanto, a taxa de produção de gás dos carboidratos fibrosos (m_2) foi 15% maior na técnica semiautomática. Por outro lado, a produção de gás oriunda da fermentação dos carboidratos não fibrosos (Vf_1) não diferiu entre as duas técnicas ($P = 0,109$), com valor médio de 123,05 ml/g MS. A dieta influenciou a Vf_1 , sendo 18% maior na dieta com alto CNF. O *lag time* não foi alterado em função da técnica ou da dieta utilizada com valor médio de 3,81 horas (Tabela 3).

Tabela 3 – Estimativa dos parâmetros de produção de gás *in vitro* de duas dietas em função de duas técnicas de produção de gás, após 72 horas de incubação e interação “dieta × técnica” para a produção total de gás (V_t).

Fonte	Parâmetros						
	ml/g MS			ml/g MS/h			h
	Vf_1	Vf_2	V_t	m_1	m_2	mt	L
<i>Técnica</i>							
Automática	126,71	65,52	192,23	0,1000	0,0246	0,1247	3,75
Semiautomática	119,39	51,02	170,41	0,1165	0,0291	0,1456	3,88
<i>Dieta</i>							
Baixo CNF	111,22	52,89	164,10	0,0968	0,0261	0,1229	3,93
Alto CNF	134,93	62,91	197,83	0,1214	0,0279	0,1493	3,70
<i>P - valor</i>							
Técnica (T)	0,109	0,033	<,0001	0,297	0,044	0,222	0,626
Dieta (D)	<,0001	0,155	<,0001	0,103	0,321	0,103	0,465
T x D	0,196	0,496	0,034	0,609	0,413	0,714	0,432
<i>EPM</i>	3,47	3,48	4,05	0,008	0,001	0,009	0,050
Interação “dieta × técnica” para V_t							
Dieta	Técnica de produção de gás		<i>P - valor</i>				
	Automática	Semiautomática					
Baixo CNF	181,76aB	147,92bB	0,0001				
Alto CNF	203,76A	192,90A	0,3631				
<i>P - valor</i>	0,0121	<0,0001					

Vf_1 – produção de gás potencial a partir dos carboidratos não fibrosos; Vf_2 – produção de gás potencial a partir dos carboidratos fibrosos; V_t – produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais; m_1 – taxa de produção de gás a partir dos carboidratos não fibrosos; m_2 – taxa de produção de gás a partir dos carboidratos fibrosos; mt – taxa de produção de gás a partir dos carboidratos totais; L – fase lag; EPM – erro padrão da média; letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Houve interação para a estimativa da produção total de gás (V_t) às 72 horas de incubação ($P = 0,034$). O V_t da dieta com alto CNF foi maior, independente da técnica utilizada, com valor médio de 198,33 ml de gás/g MS. Contudo, o V_t da dieta com baixo CNF diferiu entre técnicas, sendo 22,9% maior na técnica automática. Na comparação entre as dietas houve variação em

ambos os sistemas, com aumento de 12,1 e 30,4% na dieta com alto CNF, no sistema automático e semiautomático, respectivamente (Tabela 3).

As curvas de produção cumulativa de gás, oriunda dos carboidratos não fibrosos (Fig. 3A) e fibrosos (Fig. 3B) não diferiram quando avaliadas pelas diferentes técnicas ao longo dos períodos de avaliação. A produção de gás resultante da fermentação dos carboidratos não fibrosos, apresentou correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,94$) entre as duas técnicas (Fig. 3D) com alto coeficiente de determinação de $R^2 = 0,87$, enquanto para a produção de gás oriundo dos carboidratos fibrosos, foi observada correlação positiva forte ($r = 0,702$), contudo o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,47$) demonstrou baixo ajuste entre as técnicas (Fig. 3C).

Houve interação “técnica $\times$ tempo” para produção total de gás ($P = 0,0009$), até 48 horas de incubação. A curva de produção de gás cumulativa após 14 horas de incubação foi maior ($P < 0,05$) na técnica automática (Fig. 3C), produzindo cerca de 6,3% ($P = 0,0004$) mais gás às 48 horas de incubação em relação a semiautomática. No diagrama de dispersão foi observada correlação positiva de alta magnitude ($r = 0,96$) entre as técnicas, com alto ajuste entre as técnicas pelo coeficiente de determinação $R^2 = 0,93$ (Fig. 3F).

As figuras 3G, 3H e 3I mostram que não houve diferença entre as técnicas, automática e semiautomática, na estimativa da produção média de gás oriunda da fermentação dos carboidratos não fibrosos ($P = 0,429$), fibrosos ($P = 0,092$) e totais ($P = 0,279$), respectivamente.

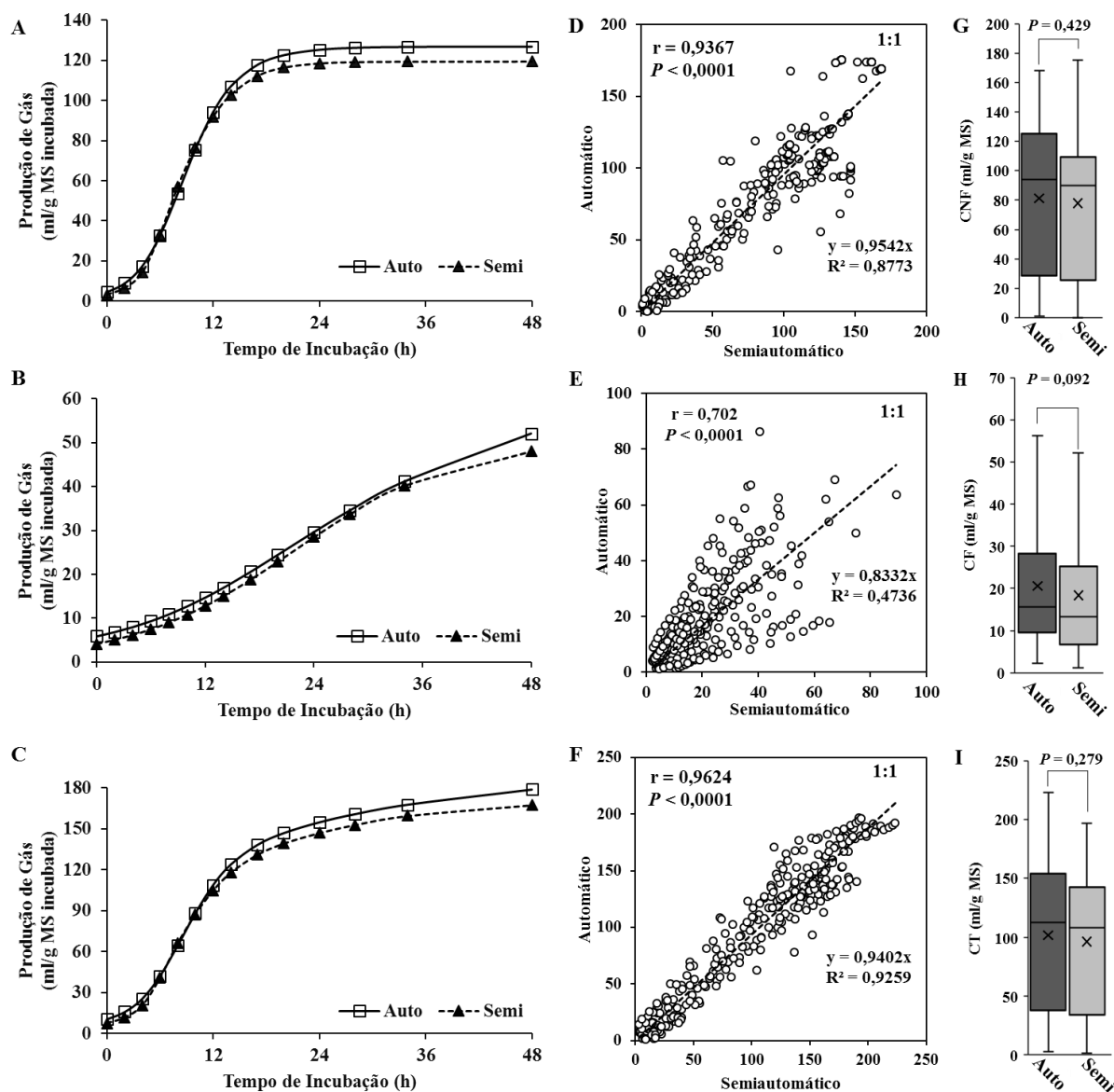


Figura 3 – Perfis de produção gás oriundos da fermentação dos carboidratos não fibrosos - CNF (A), fibrosos - CF (B), e totais - CT (C), após 48 horas de incubação; diagramas de dispersão para avaliar a correlação entre a técnica automática e semiautomática, para os CNF (D), CF (E) e CT (F); produção média de gás oriundo da fermentação dos CNF (G), CF (H) e CT (I), a partir da técnica automática e semiautomática; r = correlação entre as duas técnicas; P = significativo a 5% de probabilidade.

Após oito horas de incubação, a produção de gás oriunda da fermentação dos CNF (Fig. 4A) e a produção de gás total (Fig. 4B) foram significativamente maiores ($P < 0,05$) na dieta de alto CNF em comparação à dieta de baixo CNF, havendo maior variação ao longo do tempo de incubação.

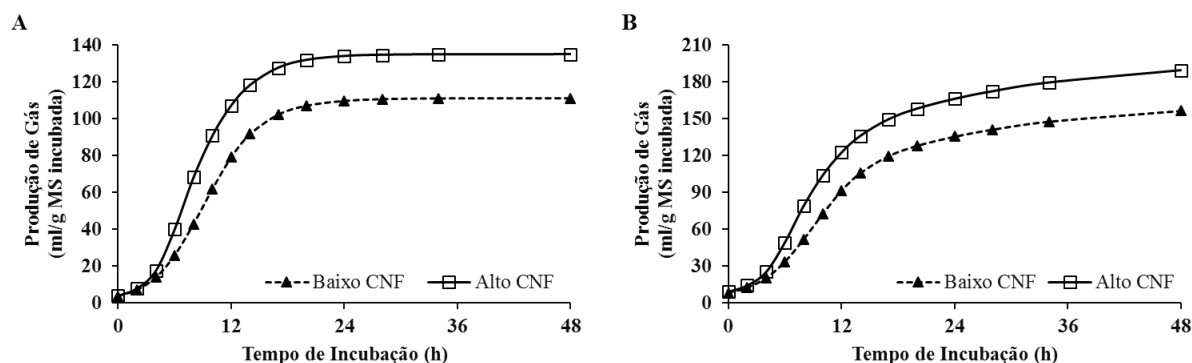


Figura 4 – Interação “dieta × tempo” para a produção média de gás dos carboidratos não fibrosos (A) ($P < 0,0001$) e carboidratos totais (B) ($P < 0,0001$).

A degradabilidade da matéria seca e da matéria orgânica foi 3,85 e 3,33%, respectivamente, maior quando avaliada através da técnica semiautomática. A dieta de alto CNF resultou em menor pH (5,88) e menor concentração de $N-NH_3$ (39,61 mg/dL) no meio de incubação, comparado à dieta de alto CNF. Além disso, a dieta com alto CNF teve maior degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica ($P < 0,0001$) em relação à dieta de baixo CNF (Tabela 4).

Houve interação para degradabilidade da proteína bruta às 48 horas de incubação ($P = 0,0026$), onde na técnica semiautomática houve incremento de 3,03 e 7,19% em relação a técnica automática para dieta de alto e baixo CNF, respectivamente. Na comparação entre as dietas, houve variação apenas no sistema semiautomático ($P < 0,0001$) com aumento de 5,12% na dieta com alto CNF (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros ruminais e degradabilidade dos nutrientes às 48 horas de incubação em função de duas técnicas de produção de gás e duas dietas e interação “dieta × técnica” para a degradabilidade da proteína bruta (DPB).

para a degradabilidade da proteína bruta (DPB).					
Fonte	pH	N-NH ₃ (mg/dL)	DMS ¹	DMO ²	DPB ³
			g/kg MS		
Técnica					
Automática	6,04	40,37	746,65	743,52	850,73
Semiautomática	6,03	42,00	775,40	768,29	897,09
Dieta					
60:40	6,20	42,76	706,73	698,55	860,24
30:70	5,88	39,61	815,32	813,26	887,57
P – valor					
Técnica (T)	0,8386	0,0704	<,0001	0,0001	<,0001
Dieta (D)	<,0001	0,0015	<,0001	<,0001	<,0001
D x T	0,2257	0,3582	0,5451	0,6455	0,0026
EPM ⁴	0,030	1,255	8,662	9,020	5,480
Interação “dieta × técnica” para DPB					
Dieta	Técnica de produção de gás			P - valor	
	Automática	Semiautomática			
Baixo CNF	847,0 b		873,5 aB	0,0044	
Alto CNF	854,5 b		920,7 aA	<0,0001	
P – valor	0,4006		<0,0001		

¹Degradabilidade da matéria seca; ²Degradabilidade da matéria orgânica; ³Degradabilidade da proteína bruta; ⁴Erro padrão da média; Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de componentes principais, os dois primeiros componentes explicaram 88,6% da variação total dos dados. As cargas fatoriais com maior contribuição para explicação do componente 1 foram, pH, DMO, DMS, *Vf1*, *m1* e *Vt* com 81,19% e para o segundo componente *Vf2*, *m2*, *Vt*, DPB e N-NH₃ com 78,91%. Caracteres como *mt*, *m1* e DPB influenciaram diretamente na resposta da dieta de alto CNF no sistema semiautomático, enquanto *Vf2*, *Vt* e *Vf1* contribuíram com a resposta da mesma dieta no sistema automático. Em relação a dieta de baixo CNF no sistema semiautomático o N-NH₃ e pH induziram diretamente o comportamento desse tratamento, enquanto a dieta de baixo CNF no sistema automático teve influência negativa dos caracteres que influenciaram a segunda dieta no sistema semiautomático (Figura 5A).

Correlações negativas de alta magnitude foram observadas entre pH x *Vf1*, *m1*, *Vt*, *mt*, DMS e DMO com $r = -0,93$, $-0,87$, $-0,81$, $-0,83$ $-0,94$ e $-0,95$, respectivamente, enquanto correlações positivas foram registradas entre *Vf1* x *Vf2*, *Vt*, DMS e DMO com $r = 0,81$, $0,97$, $0,81$ e $0,83$; *m1* x *mt*, DMS, DMO e DPB com $r = 0,99$, $0,90$, $0,88$ e $0,92$ (Figura 5A).

Através da análise de Cluster, utilizando o método de agrupamento UPGMA com base na distância de Gower, foi possível visualizar a formação de dois grupos, sendo o primeiro

formado pela dieta de alto CNF em ambos os sistemas e o segundo grupo pela dieta de baixo CNF nos sistemas automático e semiautomático (Figura 5B).

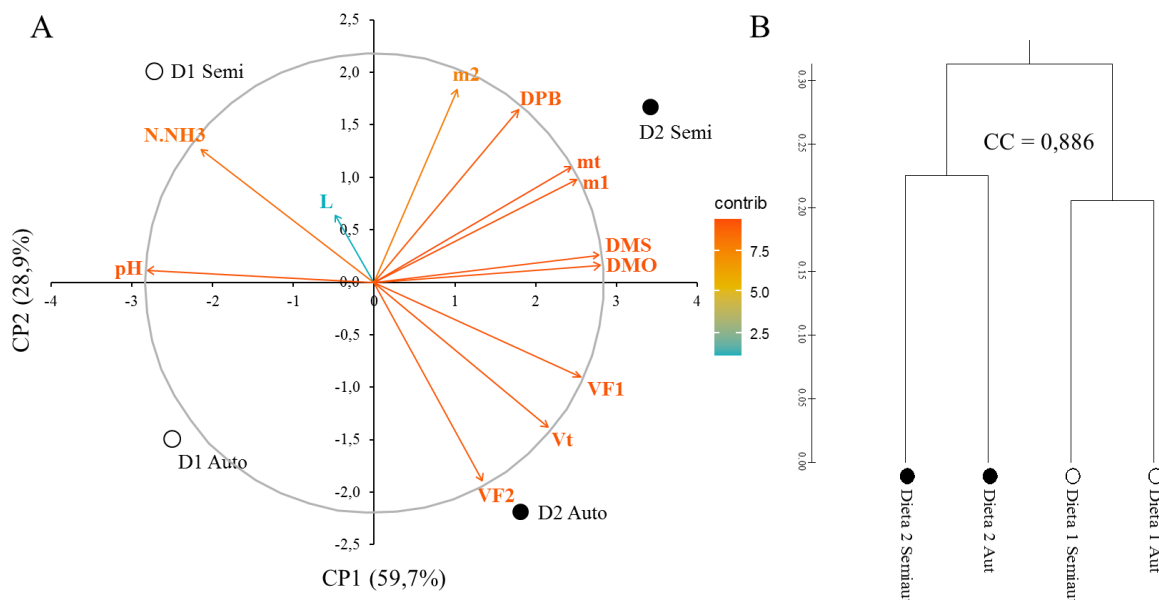


Figura 5 - Análise de componentes principais e dendrograma para estimativa dos parâmetros de produção de gás *in vitro*, parâmetros ruminais e degradabilidade dos nutrientes de duas dietas em função de duas técnicas de produção de gás. A: correlação em círculo para 12 características e dispersão dos tratamentos em função dos dois primeiros componentes, as setas representam a direção da característica e as cores de gradiente representam a contribuição de cada característica para os componentes. Do azul ao vermelho: contribuições baixas a altas; B: dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA com base na distância de Gower; Dieta 1 = baixo CNF e Dieta 2 = alto CNF.

4 DISCUSSÃO

A medição da produção cumulativa de gases, através de técnicas de produção de gás, tem permitido estimar, com sucesso, as taxas de digestão das diferentes frações dos carboidratos, partindo do princípio de que os gases produzidos são provenientes da fermentação do material incubado pelos microrganismos do rúmen (Pell e Schofield, 1993). Assim, a comparação de diferentes técnicas de produção de gás se torna necessária para aumentar a confiança dos dados gerados (Gierus et al., 2008), visto que além do equipamento utilizado, diversos outros fatores podem afetar as medidas de produção de gás, tais como procedimentos de incubação (tampão, coleta do líquido ruminal, relação tampão e líquido ruminal), espécie doadora e dieta do animal doador (Rymer et al., 2005).

Nesse estudo, foram utilizados os mesmos procedimentos de incubação para ambas as técnicas avaliadas, visando minimizar parte das fontes de variação que afetam as medidas de produção de gás *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que a estimativa dos parâmetros cinéticos da produção de gás oriundos da fermentação dos carboidratos fibrosos (Vf_2), após 72 horas de incubação, foi diferente entre as técnicas avaliadas, sendo 22% maior quando avaliada através da técnica automática. Contudo, avaliando a interação “técnica × dieta”, para a produção total de gás, estimada até 72 horas, observamos que o efeito da técnica só ocorreu na dieta de baixo CNF, sendo a produção de gás total cerca de 23% maior ($P = 0,0001$) quando avaliada através da técnica automática.

Um dos fatores que afetam a medição do gás é a alta pressão de gases no headspace dos frascos de incubação. Assim, de acordo com a lei de Henry, quando a pressão do gás é acumulada nesses frascos, uma determinada proporção de gás permanece dissolvida no meio de cultura (Theodorou et al., 1994), o que pode subestimar as medidas de produção de gás (Cattani et al., 2014). Nesse estudo, os frascos do sistema semiautomático foram ventilados em tempos fixos, após cada leitura de pressão. Por outro lado, no sistema automático, a ventilação dos frascos ocorreu quando a pressão limite no headspace atingiu 5 *psi* (34,47 kPa). Esse limiar de pressão, utilizado nesse estudo, é bem superior aos utilizados por outros autores (6,8 kPa) (Cornou et al., 2013; Katsande et al. 2015), em sistemas automatizados. Contudo, foi sugerido que somente quando a pressão no headspace ultrapassa 7 *psi* (48 kPa), é que a atividade microbiana pode ser perturbada (Theodorou et al., 1994), o que pode diminuir a fermentação dos carboidratos e, conseqüentemente, a produção de gás.

Outro fator que poderia ter afetado o resultado da produção de gás, seria a relação headspace: volume do meio de incubação. No sistema automático (ANKOM^{RF} System) essa relação

foi de 2,1:1, enquanto na técnica do transdutor de pressão (semiautomático) foi de 0,6:1. Assim, era de se esperar uma menor produção de gás no sistema automático, haja vista que grandes áreas superficiais permitem maiores trocas gasosas entre fases comparado a áreas superficiais pequenas (Paul e Fincke, 1989; Meier-Schneiders et al., 1995), o que aumenta a solubilidade dos gases no meio de incubação, principalmente CO₂ (Lowenadler e Ronner, 1994), fato não observado no presente estudo.

Vale ressaltar que, o sistema automático utilizado no presente estudo (ANKOM^{RF} System) permite a detecção, com alta frequência, de pequenas mudanças de pressão no headspace dos frascos fechados, sendo equipado com um sistema de ventilação automático que permite a manutenção de baixa pressão dentro do frasco. Além disso, possui uma abertura muito rápida da válvula (250 milissegundos) para evitar a entrada de ar (Ankom, 2011). Por outro lado, durante a leitura de pressão do sistema semiautomático, as agulhas permanecem inseridas nas tampas de borracha até a completa leitura de pressão de todos os frascos, o que certamente resulta em perdas de gases durante o período. Assim, a alta sensibilidade do sistema automático, associado às perdas de gás durante a leitura de pressão do sistema semiautomático, podem ter contribuído para uma maior produção de gás no sistema automático.

Semelhante ao encontrado no presente estudo, Cattani et al. (2014) observaram uma redução de 18% na produção de gás quando utilizou um sistema de produção de gás não ventilado, em comparação a um sistema ventilado. Vale destacar que no sistema ventilado, utilizado pelos autores, a pressão limiar foi fixada em 1 psi (6,8 kPa), valor 5 vezes inferior ao utilizado no presente estudo para o sistema ventilado.

Apesar da produção de gás total ter sido levemente inferior na técnica semiautomática, os perfis de produção cumulativa de gás mostraram que os dados de produção de gás de ambas as técnicas se ajustaram bem ao modelo matemático logístico de Schofield et al (1994). Assim, conforme observado na figura 4C, os perfis da produção de gás apresentaram uma fase inicial com produção de gás inexistente ou lenta, uma fase exponencial de produção rápida de gás e uma terceira fase, chamada assintótica, onde a produção de gás é reduzida. Além disso, os diagramas de dispersão, figuras 4D, 4E e 4F, mostraram que a produção de gás de ambas as técnicas apresentou uma correlação fortemente positiva.

A estimativa do tempo de colonização ou fase lag (*L*) não foi afetada pelo tipo de técnica, apresentando valor médio de 3,81 horas. A fase lag representa a primeira fase da curva de produção de gás, que explica o tempo de latência de hidratação, fixação e colonização do substrato insolúvel pelos microrganismos ruminais (Beuvink e Kogut, 1993). Fatores como tipo de substrato disponível, tamanho de partícula, relação volumoso: concentrado, diluição do

líquido ruminal no meio de incubação pode afetar o tempo de colonização, principalmente por comprometer a atividade microbiana (Nagadi, 2000). Assim, os resultados obtidos para essa variável estão em acordo com o esperado, haja vista que foram usados os mesmos parâmetros para ambas as técnicas.

A degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica foi reduzida em 3,7 e 3,2%, respectivamente, quando foi avaliada através da técnica automática. Além disso, a degradabilidade da proteína bruta reduziu 3,0 e 7,2% quando avaliada através da técnica automática, nas dietas de baixo e alto CNF, respectivamente. A maior parte do gás produzido é resultado da fermentação de carboidratos a acetato, propionato e butirato (Blummel e Orskov, 1993), com baixa contribuição da proteína para a produção gás e insignificante a quantidade de gás advindo da gordura (Getachew et al., 1998). Assim, é possível que essa leve redução na degradabilidade da proteína não tenha sido suficiente para provocar uma mudança nos resultados de produção de gás.

Os resultados de produção de gás de ambas as técnicas apresentaram uma alta correlação, demonstrando o seu potencial para avaliação nutricional de alimentos. É importante destacar que, apesar de serem muito sensíveis e precisas, o alto custo inicial e a maior necessidade de manutenção do sistema limitam o uso das técnicas automatizadas para muitos laboratórios. Essas dificuldades de manutenção dos módulos de fermentação foram observadas nesse estudo. Além disso, os dados de 3 dos 24 módulos usados nos ensaios (12,5%) tiveram que ser descartados, devido a vazamento de gás. Também avaliando a produção de gás através do ANKOM^{RF} System, Cornou et al. (2013) relataram as mesmas dificuldades observadas nesse estudo.

A comparação dos perfis de produção de gás das dietas testadas não é objetivo central desse estudo, uma vez que já era esperado um maior volume de gás na dieta com alto CNF. Assim, conforme o esperado, a estimativa da produção total de gás (V_t) mostrou que a dieta com alto CNF produziu 24,5% mais gás que a dieta com baixo CNF. Além disso, a produção de gás oriunda da fermentação dos CNF (V_{f1}) foi 22,3% maior e o gás advindo dos CF foi cerca de 30% maior na dieta com baixo CNF. Apesar do aumento considerável no volume de gás produzido, as taxas de produção de gás não diferiram entre as duas dietas.

Em dietas com alto teor de CNF, a produção de gás é elevada devido a maior disponibilidade de carboidratos de rápida fermentação (Tosto et al., 2015). Avaliando o uso de diferentes fontes de carboidratos associados com ureia, Santos et al. (2020) observaram um maior volume de gás quando usou mandioca como fonte de carboidratos na dieta, fato que foi associado ao seu maior conteúdo de CNF.

Em função dessa maior quantidade de CNF, a degradabilidade da MS, MO e PB foi 15,36, 16,42 e 3,17% maior, respectivamente, na dieta de alto CNF em relação à dieta de baixo CNF.

5 CONCLUSÕES

As técnicas de produção de gás automática e semiautomática, estimaram de modo semelhante os parâmetros cinéticos e os perfis de produção de gás total, demonstrando o potencial das diferentes técnicas para avaliação do valor nutricional de dietas com diferentes proporções de carboidratos não fibrosos.

REFERÊNCIAS

- ANKOM (2011). Disponível em: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf. Acesso em 07/01/2020.
- AOAC (2005). **Official method of Analysis**. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
- BEUVINK, J.M.W.; KOGUT, J. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. **Journal of Animal Science**, v.71, p.1041-1046, 1993.
- BLUMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, p.109-119, 1993.
- CATTANI, M.; TAGLIAPIETRA, F.; MACCARANA, L. et al. Technical note: *In vitro* total gas and methane production measurements from closed or vented rumen batch culture systems. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.1736-1741, 2014.
- CONE, J.W.; VAN GELDER, A.H.; VISSCHER, G.J.W.; OUDSHOORN, L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. **Animal Feed Science and Technology**, v.61, p.113-128, 1996.
- CORNOU, C.; STORM, I.M.L.D.; HINDRICHSEN, I.K. et al. A ring test of a wireless *in vitro* gas production system. **Animal Production Science**, v.53, p.585-592, 2013.
- DAVIES, Z.S.; MASON, D.; BROOKS, A.E. et al. An automated system for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, p.205-221, 2000.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. **Métodos para análises de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. 214p.
- GETACHEW, G.; BLUMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.261-281, 1998.
- GIERUS, M.; SCHIBORRA, A.; SUDEKUM, K.H. et al. Comparison of gas accumulation profiles of several feeds using manual or automated gas production methods. **Animal Feed Science and Technology**, v.147, p.310-325, 2008.
- JAYME, D.G.; GONÇALVES, L.C.; MAURÍCIO, R.M. et al. Avaliação pela técnica semiautomática de produção de gases das silagens de quatro genótipos de girassol (*Helianthus annuus*) (Rumbosol 91, Victoria 627, Victoria 807 e Mycogen 93338). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1403-1410, 2009.
- KATSANDE, S.; BALOYI, J.J.; NHERERA-CHOKUDA, F.V. et al. *In vitro* degradability of forage legumes using the Ankom^{RF} gas technique. **Indian Journal of Animal Research**, v.49, p.168-172, 2015.

LAGRANGE, S.; LOBÓN, S.; VILLALBA, J.J. Gas production kinetics and *in vitro* degradability of tannin containing legumes, alfalfa and their mixtures. **Animal Feed Science and Technology**, v.253, p.56-64, 2019.

LOWENADLER, J.; RONNER, U. Determination of dissolved carbon dioxide by coulometric titration in modified atmosphere systems. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p.285-288, 1994.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semiautomated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuffs evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.

MEIER-SCHNEIDERS, M.; SCHAFER, F.; GROSSHANS, U; BUSCH, C. Impact of carbon dioxide evolution on the calorimetric monitoring of fermentations. **Thermochimica Acta**, v.251, p.85-97, 1995.

MENEZES, D.R.; COSTA, R.G.; ARAÚJO, G.G.L. et al. Cinética ruminal de dietas contendo farelo de mamona destoxificado. **Arquivo Brasileiro Medicina veterinária e Zootecnia**, v.67, n.2, p.636-641, 2015.

NAGADI, S.A. **Development of the *in vitro* gas production technique to assess degradability of forages by ruminants**. Tesis. The University of Edinburgh, Edinburgh, UK, 202p.

PAUL, R.J.; FINCKE, T. Book lung function in arachnids II. Carbon dioxide release and its relation to respiratory surface, water loss and heart frequency. **Journal of Comparative Physiology B**, v.159, p.419-432, 1989.

PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal Dairy Science**, v.76, p.1063-1073, 1993.

R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J.A.; WILLIAMS, B.A.; GIVENS, D.I. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.9-30, 2005.

SANTOS, K.C.; CARVALHO, F.F.R.; CARRIERO, M.M. et al. Use of different carbohydrate sources associated with urea and implications for *in vitro* fermentation and rumen microbial populations. **Animal Production Science**, p.1-11, 2020.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2980-2991, 1994.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.

SUDHIR, K., GLEN, S., KOICHIRO, T. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v.33, p.1870-1874, 2016.

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, p.185-197, 1994.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal British Grassland Society**, v.18, p.104-109, 1963.

TOSTO, M.S.L.; ARAÚJO, G.G.L.; RIBEIRO, L.G.P. et al. *In vitro* rumen fermentation kinetics of diets containing oldman saltbush hay and forage cactus, using a cattle inoculum. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.149-158, 2015.

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.

ZHONG, R.Z.; FANG, Y.; SUN, H.X. et al. Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. **Journal of Integrative Agriculture**, v.15, p.414-423, 2016.

CAPÍTULO III

Cinética de produção de gás e degradabilidade *in vitro* de dietas contendo extrato vegetal da Catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul. L. P. Queiroz)

RESUMO

O objetivo com o presente estudo foi avaliar o efeito da inclusão de extrato vegetal de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz sobre a cinética de produção de gases e a degradabilidade de dietas com diferentes proporções de carboidratos não fibrosos (CNF). O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4×2 , com quatro níveis de inclusão de extrato [0, 3, 6, 9% da matéria seca (MS)] e duas dietas (baixo CNF e alto CNF), e três repetições, sendo os blocos representados por dois ensaios. Na dieta de alto CNF, a degradabilidade da proteína bruta foi reduzida linearmente com o aumento dos níveis de extrato de *P. pyramidalis*, tanto às 24 horas ($P = 0,0009$) quanto às 48 horas ($P = 0,0036$) de incubação. Houve efeito quadrático ($P = 0,0009$) do extrato de *P. pyramidalis* sobre a degradabilidade da fibra em detergente neutro, com ponto de máximo estimado em 609,7 g/kg de MS para o nível de 2,16%. Houve redução linear do pH ($P = 0,0001$), N-NH₃ ($P = 0,0002$), proporção molar de acetato ($P = 0,0363$) e da relação acetato: propionato ($P = 0,0118$) com o aumento dos níveis de extrato. A dieta com baixo CNF resultou em maior valor de pH (6,44 vs 6,28), N-NH₃ (20,13 vs 17,49 mg/dL), AGCC (31,87 vs 23,64 mmol/L) e proporção molar de acetato (63,98 vs 58,09 mol/100 mol) comparado à dieta de alto CNF. A adição de extrato de *P. pyramidalis* aumentou de forma linear ($P = 0,0419$) a produção de gás média (ml/g MO). A dieta de alto CNF resultou em maior volume (ml/g MS) e maiores taxas de produção de gás ($P < 0,0001$) e maior *lag time* ($P = 0,0290$) comparado à dieta de baixo CNF. A inclusão de extrato de *P. pyramidalis* em ambas dietas avaliadas modificou o padrão de fermentação ruminal, favorecendo a produção de propionato e reduzindo o acetato. O efeito do extrato sobre a degradabilidade da proteína bruta foi mais acentuado na dieta com alto CNF, observando-se uma redução da degradabilidade de proteína bruta com o aumento dos níveis de *P. pyramidalis*. A degradabilidade da fibra em detergente neutro foi favorecida até o nível de 2,16% de extrato, a partir desse nível reduziu.

Palavras – chave: Ácidos graxos de cadeia curta. Amônia. Extratos de plantas. Fermentação ruminal. *Poincianella pyramidalis* (Tul.)

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of including *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz extract on gas production kinetics and the degradability of diets with different proportions of non-fibrous carbohydrates (NFC). A randomized block design in a 4×2 factorial arrangement was adopted, with four levels of extract inclusion [0, 3, 6, 9% of dry matter (DM)], two diets (low NFC and high NFC), and three replicates. The blocks represented two *in vitro* runs. In the high NFC diet, protein degradability was linearly reduced with increase of *P. pyramidalis* extract levels, both at 24 hours ($P = 0.0009$) and 48 hours ($P = 0.0036$) of incubation. There was a quadratic effect ($P = 0.0009$) of *P. pyramidalis* extract on the fiber in neutral detergent degradability, with a maximum point estimated at 609.7 g/kg DM for the level of 2.16%. There was a linear reduction in pH ($P = 0.0001$), N-NH₃ ($P = 0.0002$), acetate molar proportion ($P = 0.0363$) and the acetate: propionate ratio ($P = 0.0118$) with increase of extract levels. The low NFC diet resulted in a higher pH value (6.44 vs 6.28), N-NH₃ (20.13 vs 17.49 mg / dL), AGCC (31.87 vs 23.64 mmol/L) and molar proportion of acetate (63.98 vs 58.09 mol/100 mol) compared to the high NFC diet. The addition of *P. pyramidalis* extract increased linearly ($P = 0.0419$) the average gas production (ml/g OM). The high NFC diet resulted in greater volume (ml/g DM) and higher gas production rates ($P < 0.0001$) and greater lag time ($P = 0.0290$) compared to the low NFC diet. The inclusion of *P. pyramidalis* extract in both diets modified the rumen fermentation pattern, favoring the production of propionate and reducing acetate. The effect of the extract on the degradability of crude protein was more impressive in the high NFC diet, with a reduction of crude protein degradability with increasing levels of *P. pyramidalis*. The neutral detergent fiber degradability was favored up to the level of 2.16% of extract and, from that level decreased.

Key words: Ammonia. Plant extracts. *Poincianella pyramidalis*. Ruminal fermentation. Short-chain fatty acids

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com a proibição do uso de aditivos químicos na alimentação animal, a exemplo dos antibióticos, tem se tornado cada vez mais comum, a busca por alternativas naturais que exerçam influência sobre os produtos da fermentação ruminal, e ao mesmo tempo, possam amenizar os problemas ambientais. Isso se deve, em parte, à tentativa de reduzir o risco de aparecimento de resíduos químicos em produtos de origem animal e o desenvolvimento de bactérias resistentes a essas substâncias, além da pressão exercida sobre a pecuária para diminuir a emissão de gases contribuintes do aquecimento global, como os produzidos a partir da fermentação entérica dos ruminantes.

Nesse sentido, plantas ou extratos de plantas contendo metabólitos secundários (MSP), que são moléculas biologicamente ativas, não envolvidas em processos bioquímicos primários (Bodas et al., 2012), mas que são essenciais à sobrevivência das plantas, têm sido largamente explorados na produção de ruminantes por contribuir com redução da metanogênese, além de diminuir a degradação da proteína ruminal, aumentando assim, a produção de proteína microbiana e o fluxo de proteína para o duodeno (Wallace, 2004).

A “Caatinga”, pastagem natural da região Nordeste, possui uma grande diversidade de espécies forrageiras em seus três estratos, herbáceo, arbustivo e arbóreo. Em virtude da grande diversidade de espécies forrageiras disponíveis, a vegetação da Caatinga participa significativamente da composição da dieta de ruminantes, principalmente, caprinos e ovinos.

Nesse Domínio fitogeográfico, a *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz, conhecida popularmente como “Catingueira” ou “pau de rato” está presente de forma bem representativa (Lewis, 1998). Pertencente à família *Fabaceae*, as cascas e folhas de *P. pyramidalis* são amplamente utilizadas na medicina popular, principalmente no tratamento de febre e distúrbios estomacais e também são usadas como diurético pelos habitantes locais (Gomes-Copeland et al., 2018). Além disso, essa espécie é utilizada como fonte de madeira (Paula e Alves, 2007) e também como uma importante fonte de forragem para ruminantes (Queiroz, 2009).

Quando utilizada como forragem, o consumo de *P. pyramidalis* é reduzido no início de sua fase vegetativa. No entanto, após sua senescência, as folhas são rapidamente consumidas pelos ruminantes (Araújo Filho e Carvalho, 1998). Esse consumo reduzido na fase vegetativa se dá em função da menor palatabilidade das folhas, causadas pela presença de compostos fenólicos, principalmente taninos (Fonteles, 2016). Além da presença de taninos, estudos sobre

sua composição química indicaram a presença de flavonoides, biflavonóides, triterpenos e fenilpropanóides nas folhas, cascas e raízes (Bahia et al., 2005; Oliveira et al., 2016).

Diante destas informações, objetivou-se avaliar o efeito do extrato vegetal da catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul. L. P. Queiroz), sobre a cinética de produção de gás e degradabilidade *in vitro* e produção de ácidos graxos de cadeia curta em dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na unidade de Produção de Gás do Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal - LAANA, pertencente ao Centro de Ciências Agrárias – CCA, da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Areia-PB.

O estudo foi realizado de acordo com os critérios relativos aos cuidados com animais experimentais, sendo o uso de animais fistulados no rúmen submetido ao comitê de ética e bem-estar animal da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) (CEUA nº 9866190719).

2.1 COLHEITA DAS PLANTAS

Para realização do estudo, foram coletados folhas completamente expandidas e ramos com até 3 mm de espessura de catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul. L. P. Queiroz), em uma área de Caatinga no município de Pesqueira – PE. A espécie coletada foi identificada e depositada no herbário Jaime Coelho de Moraes.

A colheita do material vegetal foi realizada durante os horários de 08:00 às 10:00 horas e das 15:00 às 17:00 horas. Imediatamente após a colheita, as folhas foram transportadas para o LAANA/CCA/UFPB, onde realizou-se o procedimento de secagem do material vegetal. A secagem foi feita em estufa de circulação de ar ($\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo em seguida moídas em moinho de facas tipo Willey (Modelo MA 580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil), usando peneiras com crivo de 5 mm para posterior obtenção do extrato vegetal e determinação dos compostos secundários.

2.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO

A preparação do extrato etanólico de *P. pyramidalis* se deu no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos pertencente a Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM / UFPB – João Pessoa/PB – Brasil), sendo obtido através de processo de maceração exaustiva, onde cada extração teve uma duração de 72 horas. Após o extrato ser obtido, este foi concentrado em rotaevaporador sendo realizada, posteriormente, a análise de screening fitoquímico (Tabela 1) de acordo com metodologia proposta por Matos et al. (1997) e Souza e Silva (2006). O princípio dos testes se baseia na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

Tabela 1 – Screening fitoquímico do extrato etanólico e quantificação dos compostos secundários de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz

Alcaloides				⁴ Est	Taninos		Flavonoides		⁹ Sap
¹ Bou	Mayer	² Dra	³ AST		⁵ Gel	⁶ FeCl+3	⁷ Mag	⁸ Fluo	
-	-	-	-	++	++	+	++	+++	++

Metabólito Secundário	Concentração
Fenóis totais	227,38 mg [*] EAT/g de extrato seco
Taninos totais	136 mg [*] EAT/g extrato seco
Flavonoides totais	130 mg ^{**} ER/g de extrato seco

¹Bouchardat, ²Dragendorff, ³Ácido Sílico-Tungstíco, ⁴Esteróides, ⁵Gelatina à 0,5%, ⁶Cloreto férrico a 2%, ⁷Fita de Magnésio, ⁸Fluorescência, ⁹Saponinas; ^{*}Equivalente ácido tânico, ^{**}Equivalente rutina; Ausência (-); Presença fraca (+); Presença média (++); Presença forte (+++)

2.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS

A quantificação dos principais compostos secundários dos extratos de *P. pyramidalis* foi realizada no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Federal da Paraíba (LAANA/UFPB/CCA – Areia/PB - Brasil). Foram quantificados os compostos fenólicos totais, taninos totais e flavonoides totais, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Libra S12, biochrom) (Tabela 1).

2.3.1 Polifenóis totais

Foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Singleton e Rossi (1965). Assim, adicionou-se 500 µl de reagente Folin em 100 µl de extrato etanólico bruto, seguido de incubação em temperatura ambiente durante 2 min. Em seguida, foi adicionado à mistura, 400 µl de carbonato de sódio a 7,5%, sendo a mistura, incubada em banho-maria a 50 °C durante 15 min e logo em seguida, resfriada em água gelada. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 760 nm. A curva de calibração foi obtida com soluções de ácido tânico, sendo o resultado final expresso em mg de equivalente ácido tânico por g de amostra (Fernandes et al., 2016).

2.3.2 Taninos totais

A concentração de taninos totais foi estimada usando o método Folin-Ciocalteu. A mistura, 1 ml de extrato de *P. pyramidalis* e 1 ml de reagente folin, foi incubada em temperatura ambiente durante três min. Em seguida, adicionou-se 1 ml de carbonato de sódio a 8%, seguido por homogeneização e repouso por duas horas. A leitura das absorbâncias foi realizada em comprimento de onda de 725 nm. A curva de calibração foi obtida com solução de ácido tânico (AT), e o resultado expresso em mg de equivalente AT / g de amostra (Pansera et al., 2003).

2.3.3 Flavonoides totais

Os flavonoides totais foram quantificados misturando-se 500 µl de extrato e 500 µl de cloreto de alumínio a 2%. Em seguida, os tubos foram homogeneizados e incubados em temperatura ambiente, protegidos da luz, durante 40 min. As leituras das absorbâncias foram realizadas em comprimento de onda de 425 nm. A curva de calibração foi obtida com soluções de rutina, e o resultado final expresso em mg de equivalente rutina por g de amostra (Miliauskas et al., 2004; Marques et al., 2012).

2.4 DIETAS EXPERIMENTAIS

Os ingredientes utilizados para confecção das dietas experimentais foram feno de tifton, milho moído e farelo de soja. Todos os ingredientes foram moídos em moinho de facas tipo Willey (Modelo MA580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil), utilizando peneiras de crivo de 1,0 mm. A composição química dos alimentos e das dietas experimentais foi determinada de acordo com a AOAC (2005) (Tabela 2). Foram realizadas análises de matéria seca (MS) (*método 934.01*), matéria mineral (MM) (*método 942.05*), proteína bruta (PB) (*método 954.01*) e extrato etéreo (EE) (*método 920.39*). A fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas pelo método de Van Soest et al. (1991), utilizando analisador de fibra da ANKOM (ANKOM²⁰⁰ Fibre Analyzer – ANKOM Technology Corporation, Fairport, NY, EUA). Os carboidratos totais (CT) foram estimados por meio da equação proposta por Sniffen et al. (1992), $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ e os carboidratos não-fibrosos (CNF) segundo Van Soest et al. (1991), $CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)$.

Tabela 2 – Composição química dos ingredientes e das rações experimentais

Ingredientes	Composição química (g/kg MS)							
	MS ¹	MM ²	PB ³	EE ⁴	FDN ⁵	FDA ⁶	CT ⁷	CNF ⁸
<i>Feno de tifton</i>	926,0	98,5	97,2	17,6	781,0	428,5	786,7	5,7
<i>Milho moído</i>	883,9	22,3	103,0	43,3	176,6	44,9	831,4	654,8
<i>Farelo de soja</i>	893,9	63,7	480,9	13,5	153,3	86,9	441,9	288,6
Dietas experimentais								
<i>Dieta Baixo CNF</i>	910,7	75,3	160,7	25,5	580,4	304,8	812,5	158,1
<i>Dieta Alto CNF</i>	899,0	52,0	158,8	34,9	387,6	180,7	845,2	366,7
	Proporção dos ingredientes da dieta (g/kg MS)							
	Feno de tifton		Milho moído			Farelo de Soja		
<i>Dieta Baixo CNF</i>	608,0		230,0			162,0		
<i>Dieta Alto CNF</i>	307,0		540,0			152,0		

¹Matéria Seca, ²Matéria Mineral, ³Proteína Bruta, ⁴Extrato Etéreo, ⁵Fibra em Detergente Neutro, ⁶Fibra em Detergente Ácido, ⁷Carboidratos Totais, ⁸Carboidratos Não Fibrosos.

2.5 DEGRADAÇÃO E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO*

2.5.1 Animais doadores

Dois ovinos Santa Inês (40 ± 3 kg de peso vivo), com fístula ruminal, foram usados como doadores do líquido ruminal utilizado como inoculante nos ensaios. Os animais foram alimentados, durante 15 dias antes do início do experimento, com uma dieta à base de capim-elefante e suplementados diariamente com 0,4 kg de concentrado, composto por milho moído, farelo de soja e suplemento mineral. Os animais tiveram livre acesso a água de bebida.

2.5.2 Preparação do inóculo microbiano

O líquido ruminal foi coletado duas horas após a alimentação matinal. Após coletado, este foi filtrado através de quatro camadas de gaze, armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39 °C e imediatamente levadas ao laboratório. O líquido coletado dos dois animais doadores foi misturado em proporções iguais, sendo continuamente purgados com CO₂, para garantir as condições de anaerobiose.

2.5.3 Preparo do meio de incubação

O meio de incubação foi preparado conforme descrito por Theodorou et al. (1994). Assim, este foi preparado pela mistura de 500 ml de água destilada, 200 ml da solução tampão, 200 ml da solução de macrominerais, 60 ml do agente redutor e 0,1 ml da solução de microminerais. Não foi adicionado o indicador “resazurina” na solução redutora. Uma corrente de dióxido de carbono (CO₂) foi borbulhada no meio por pelo menos três horas antes do uso, até que o pH estivesse estabilizado entre 6,8 e 6,9. Os reagentes utilizados para o preparo do meio e suas proporções são apresentados na tabela 3.

2.5.4 Níveis testados e diluição do extrato

Para formação dos níveis 0, 3, 6 e 9% de extrato / g de substrato, foram pesados 0, 0,032, 0,064 e 0,096 g de extrato seco de *P. pyramidalis*. Cada dose de extrato pesada foi diluída em 3 ml de Dimetilsulfóxido (DMSO). No tratamento com 0% de extrato (controle), foi utilizado apenas os DMSO puro (3 ml).

Tabela 3 – Composição das soluções usadas para preparar o meio de incubação, conforme descrito por Theodorou et al. (1994).

Solução		
<i>Buffer</i>	(g/l)	
NH ₄ HCO ₃		4,0
NaHCO ₃		35,0
<i>Macrominerais</i>	(g/l)	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O		9,45
KH ₂ PO ₄		6,2
MgSO ₄ .7H ₂ O		0,6
<i>Microminerais</i>	(g/100 ml)	
CaCl ₂ .2H ₂ O		13,2
MnCl ₂ .4H ₂ O		10,0
CoCl ₂ .6H ₂ O		1,0
FeCl ₂ .6H ₂ O		8,0
<i>Agente redutor</i>		
Cisteína HCL.1H ₂ O		0,625 g
Na ₂ S.7H ₂ O		0,625 g
1M NaOH		4 ml
Água destilada		95 ml

2.5.5 Preparo dos frascos de incubação

Os ingredientes das rações testadas foram moídos (gramatura = 1 mm) e pesados separadamente em sacos de náilon (5 x 10 cm), com tamanho de poro de 50 µm, (1g de ração/saco), que foram colocados em frascos de vidro de 160 ml. Foi adicionado em cada frasco 87 ml do meio de incubação (Theodorou et al., 1994) e três ml do extrato da *P. pyramidalis* diluído (diferentes níveis), totalizando 90 ml. Posteriormente o meio de incubação foi borbulhado com CO₂ por 20 segundos, sendo os frascos em seguida, selados com tampa de borracha e colocados em caixas de madeira. Para evitar qualquer tipo de fermentação, os frascos foram colocados em geladeira e mantidos sob refrigeração a 4 °C durante a noite (Fig. 1A).

Cinco horas antes do início do ensaio, as caixas com os frascos de incubação foram transferidas para a estufa de produção de gás (Fig. 1B), mantidas à temperatura de 39°C, para garantir que o meio de incubação estivesse na mesma temperatura (39°C) no momento da inoculação do líquido ruminal.

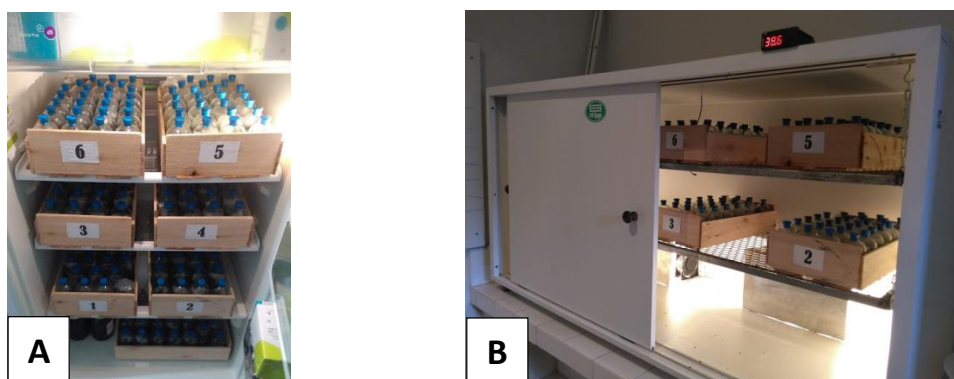


Figura 1 – (A) Frascos de incubação mantidos sob refrigeração (4 °C); (B) Caixas com frascos de incubação na estufa de produção de gás (39 °C).

No laboratório, o líquido ruminal foi mantido sob injeção contínua de CO₂ e em banho-maria, a 39 °C. O líquido ruminal (10 ml) foi injetado nos frascos de incubação através da rolha de borracha, utilizando uma seringa de 20 ml com uma agulha hipodérmica de 18G x 1½ (40mm x 1,20mm) (Lagrange et al., 2019), proporção de 9:1 (v:v) meio tampão: líquido ruminal. Após a injeção do inóculo nos frascos, a agulha foi mantida fixada na tampa por alguns segundos, para que eventuais gases injetados ou mesmo formados dentro dos frascos fossem eliminados (pressão zero). Em seguida, os frascos foram manualmente agitados e colocados em estufa a 39 °C (tempo zero).

2.5.6 Cinética de produção de gás e degradabilidade dos nutrientes

A cinética de produção de gás foi avaliada através da técnica de produção de gás semiautomática proposta por Mauricio et al. (1999) e modificada por Menezes et al. (2015). A pressão nos frascos foi medida por um indicador de pressão (DPI 705, Druck Ltd., General Electrics®; Leicester, UK), inserindo através das tampas dos frascos uma agulha de 21G x 1” (0,80 x 25 mm) que foi presa ao transdutor de pressão. As leituras de pressão (em *psi*) foram tomadas em uma frequência maior durante o período inicial da fermentação. A produção de gás foi registrada nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72 e 96 horas. A agulha acoplada ao transdutor de pressão foi inserida através da tampa de borracha e a pressão medida nos tempos citados. O transdutor foi, então, removido e a agulha mantida inserida à tampa por alguns segundos, para completa estabilização entre pressão interna e externa. O processo foi repetido em todos os frascos de cada bandeja (26 frascos por bandeja), que foram agitados manualmente e recolocadas na estufa. Os dados foram transformados em volume pela equação: $V = (4,4392 \times p) + 0,8943$.

Ao final de cada período pré-determinado da fermentação (2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas), os frascos foram removidos da estufa, sendo em seguida realizada a leitura do pH do meio. Posteriormente, os mesmos foram levados para geladeira (4 °C), para interrupção da fermentação.

A produção cumulativa de gás foi analisada pelo modelo logístico bicompartimental (Schofield et al., 1994):

$$V_t = \frac{Vf_1}{1 + e^{2-4m_1(T-L)}} + \frac{Vf_2}{1 + e^{2-4m_2(T-L)}}$$

Onde: V_t – volume máximo total de produção de gás, Vf_1 – volume máximo de gás para a fração de rápida degradação (carboidratos não fibrosos – CNF), Vf_2 – volume máximo de gás para a fração de degradação lenta (carboidratos fibrosos – CF), m_1 – taxa de produção de gás para a fração de rápida degradação, m_2 – taxa de produção de gás para a fração de degradação lenta, L – tempo de colonização (fase *lag*) e T – tempo de fermentação.

A degradabilidade da matéria seca das rações foi determinada pela remoção dos sacos de náilon (Menezes et al., 2015) às 24 e 48 horas de incubação. A remoção se deu após a refrigeração dos frascos para interromper a fermentação microbiana, sendo posteriormente lavados em água corrente e pesados após secagem por 12 horas em estufa de 65 °C e duas horas em estufa de 105 °C. A degradabilidade foi calculada pela diferença de pesagem do saco com amostra antes e após a incubação. Foi determinada a degradabilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e fibra em detergente neutro (FDN).

2.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA FERMENTAÇÃO RUMINAL

A avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal foi feita a partir do líquido de incubação coletado nos frascos de fermentação. O líquido foi então homogeneizado e o pH mensurado através de leitura direta potenciômetro digital portátil (K39-0014PA – KASVI). Posteriormente, uma alíquota de 20 ml do líquido foi acondicionada em frascos contendo 2 ml de ácido metafosfórico (20%) e armazenados a -20 °C, para posterior determinação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC); em outro frasco foram armazenados cerca de 40 ml de líquido sem ácido para mensuração do nitrogênio amoniacal (N-NH₃). Este foi determinado conforme técnica descrita por Detmann et al. (2012) (INCT - CA N-007/1) onde, no momento da análise, as amostras foram descongeladas, acrescidas de ácido tricloroacético e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos.

A análise de AGCC foi feita através da técnica de cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo a gás, modelo GC – Master. Assim, as amostras colhidas após 24 horas de incubação, foram descongeladas em temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante armazenados em ependorfs. Para obtenção da curva de calibração dos AGCC, foram preparados padrões individuais na concentração de 0,5% para ácidos acético, propiônico e butírico, sendo posteriormente injetados no equipamento. O tempo de leitura de cada amostra durou cerca de quatro minutos. Após a leitura das amostras, os gráficos foram interpretados através de software Peaksimple, gerando as proporções de cada ácido graxo analisado.

2.7 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, em arranjo fatorial 4 x 2 (quatro níveis de extrato e duas dietas experimentais). Foram utilizadas duas dietas experimentais com diferentes relações volumoso: concentrado (60:40 e 30:70) e quatro níveis de extrato vegetal de catingueira (0, 3, 6 e 9% de extrato em relação ao substrato), conforme modelo geral:

$$Y_{ijkl} = \mu + E_i + D_j + ED_{ij} + B_k + e_{ijkl}$$

Onde, Y_{ijkl} = valor observado; μ = média geral do experimento; E_i = efeito fixo da dose de extrato ($i = 0, 3, 6$ e 9%); D_j = Efeito fixo da dieta ($j =$ dieta 1 e 2); ED_{ij} =efeito da interação “extrato $\times$ dieta”; B_k =efeito fixo do bloco ($k =$ ensaio 1 e 2); e_{ijkl} = erro experimental aleatório.

Foram realizados dois ensaios com duração de 96 horas cada, em diferentes semanas, considerados como blocos. Em cada ensaio, foram utilizados sete caixas. Cada caixa continha 26 frascos, sendo oito tratamentos, com três repetições e dois frascos contendo apenas a mistura de tampão e fluido ruminal, que foram incluídos como brancos, para ajuste da produção de gás.

Os parâmetros cinéticos da produção de gás e o ajuste das curvas foram estimados utilizando o procedimento para modelos não lineares (PROC NLIN) do software estatístico SAS University (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento PROC MIXED do SAS e a comparação entre as médias, para as dietas e interação “dieta $\times$ extrato”, foi obtida aplicando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os níveis do extrato foi feita análise de variância pelo procedimento do modelo linear generalizado (PROC MIXED), e posteriormente, foi aplicada a análise de regressão pelo procedimento PROC REG do SAS.

3 RESULTADOS

3.1 DEGRADABILIDADE DOS NUTRIENTES

A degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica, às 24 e 48 horas de incubação, não foi afetada pela adição de extrato de *P. pyramidalis* ($P > 0,05$). A degradabilidade dos nutrientes foi maior na dieta de alto CNF em comparação à de baixo CNF, exceto para a degradabilidade da fibra em detergente neutro às 48 horas de incubação, que apresentou valor médio de 586,05 g/kg MS ($P = 0,1563$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Degradabilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e da fibra em detergente neutro em função dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* e das dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.

Fonte	DMS ¹		DMO ²		DPB ³		DFDN ⁴	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
g/kg de MS								
<i>Extrato</i>								
Cont.	649,6	769,2	639,6	763,5	749,2	895,4	425,7	598,1
3%	647,5	764,4	635,3	760,3	713,3	882,5	427,7	623,5
6%	640,1	755,7	627,0	752,2	711,7	880,8	407,4	574,0
9%	620,5	741,9	604,7	737,8	692,9	871,8	402,0	548,4
<i>P</i> - valor								
<i>L</i>	0,2481	0,2593	0,1930	0,3149	0,0055	0,0234	0,0565	0,0009
<i>Q</i>	0,6344	0,8011	0,6439	0,7703	0,5207	0,7778	0,7288	0,0403
<i>Dieta</i>								
BCNF	580,4	698,6	564,0	690,6	686,0	863,4	390,6	578,0
ACNF	698,4	817,0	689,3	816,2	747,6	901,9	440,8	594,1
<i>P</i> - valor	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,1563
<i>E x D</i>								
<i>P</i> - valor	0,8902	0,9625	0,6986	0,7336	0,0009	0,0036	0,0070	0,0868
<i>EPM</i>	17,860	10,552	17,632	11,483	27,837	12,291	23,171	38,591

¹Degradabilidade da Matéria Seca; ²Degradabilidade da Matéria orgânica; ³Degradabilidade da Proteína bruta;

⁴Degradabilidade da fibra em detergente neutro

BCNF – dieta de baixo CNF; ACNF – dieta de alto CNF; *L* – linear; *Q* – quadrático; *EPM* – erro padrão da média

A adição de extrato de *P. pyramidalis* resultou num efeito quadrático para a degradabilidade da fibra em detergente neutro às 48 horas de incubação, com ponto de máximo estimado em 609,7 g/kg de MS para o nível de extrato de 2,16% (Tabela 4; Fig. 2).

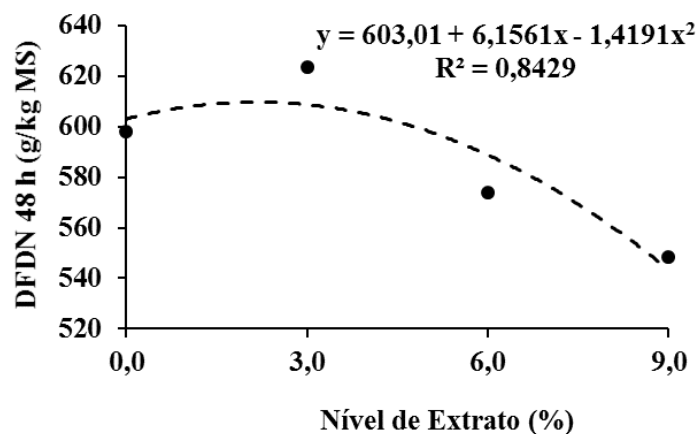


Figura 2 – Degradabilidade da fibra em detergente neutro às 48 horas ($P = 0,0403$) em função dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* (0, 3, 6 e 9%).

Houve interação “extrato $\times$ dieta” para a degradabilidade da proteína às 24 e 48 horas e do FDN às 24 horas de incubação. Na dieta de alto CNF, a degradabilidade da proteína reduziu linearmente com o aumento dos níveis de extrato de *P. pyramidalis*, às 24 horas (Fig. 3A) e às 48 horas (Fig. 3B) de incubação. Por outro lado, na dieta de baixo CNF, o extrato de *P. pyramidalis* afetou de forma quadrática a degradabilidade da proteína bruta às 24 horas de incubação, com menor degradabilidade estimada em 670,54 g/kg de MS, para a dose de 4,87% de extrato (Fig. 3A). O extrato de *P. pyramidalis* reduziu linearmente a degradabilidade da fibra em detergente neutro da dieta de alto CNF às 24 horas de incubação (Fig. 3C).

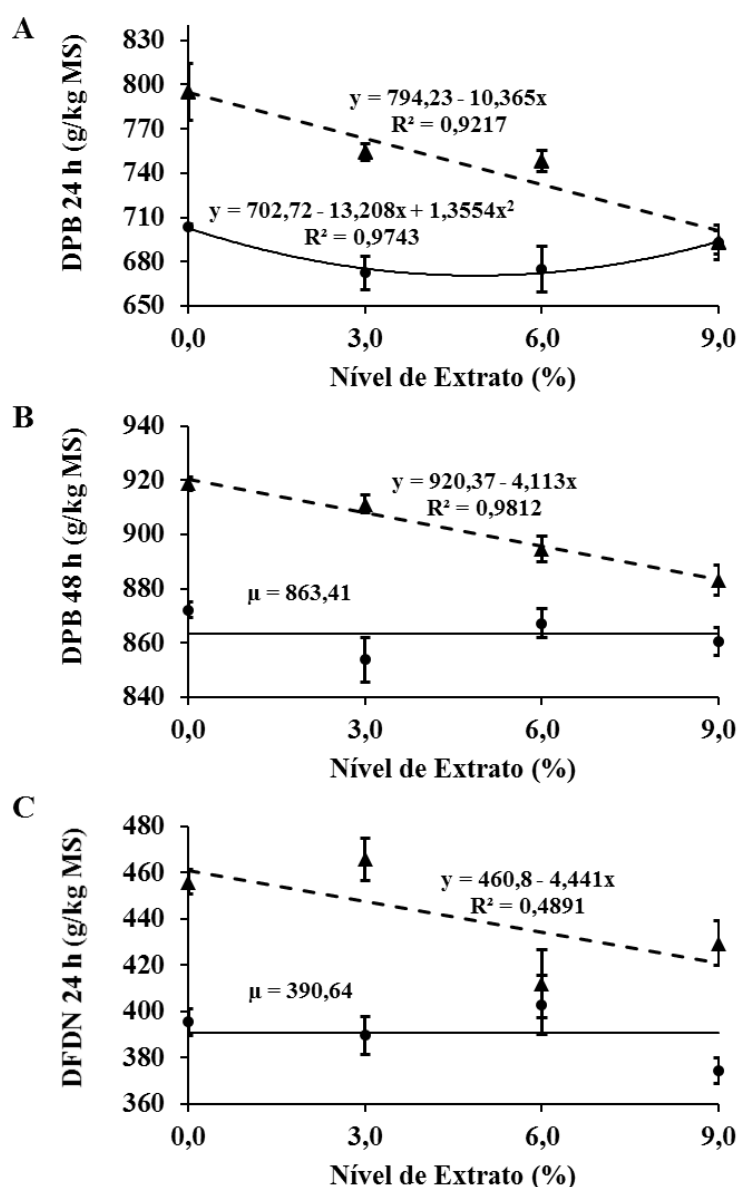


Figura 3 – Interação “extrato × dieta” para a degradabilidade da proteína bruta às 24 horas (a) ($P = 0,0009$) e 48 horas (b) ($P = 0,0036$), e da fibra em detergente neutro às 24 horas (c) ($P = 0,0070$); dieta de baixo CNF (—●—) e dieta de alto CNF (---▲---).

3.2 PARÂMETROS RUMINAIS (pH, N-NH₃ e AGCC)

O aumento dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* reduziu linearmente o pH (Fig. 4A), a concentração de N-NH₃ (Fig. 4B) e a proporção molar de acetato do meio de incubação e, por outro lado, aumentou a proporção de propionato. Como consequência, a relação acetato: propionato foi reduzida ($P = 0,0118$), variando de 2,57 para 1,90. Apesar disso, a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) não foi afetada pela adição de extrato ($P > 0,05$), apresentando valor médio de 27,76 mmol/L (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros ruminais *in vitro* em função dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* e das dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.

	Dose de Extrato				P - Valor		Dieta		P - Valor		EPM
	0%	3%	6%	9%	Linear	Quad	BCNF	ACNF	Dieta	E x D	
pH	6,43	6,36	6,34	6,30	0,0001	0,5925	6,44	6,28	<0,0001	0,2446	0,0646
N-NH ₃ (mg/dL)	20,29	18,94	18,26	17,75	0,0002	0,3836	20,13	17,49	<0,0001	0,1013	1,6030
AGCC (mmol/L)	33,66	20,90	30,62	25,85	0,5414	0,4352	31,87	23,64	0,0297	0,0648	6,2348
Proporção molar (mol/100 mol)											
¹ Acetato	65,20	62,55	58,02	58,37	0,0363	0,5534	63,98	58,09	0,0223	0,6297	4,1660
² Propionato	25,39	26,46	30,91	30,84	0,0056	0,7035	27,69	29,11	0,39b55	0,7661	3,1555
Butirato	9,40	10,99	11,07	10,79	0,5496	0,5636	8,33	12,80	0,0026	0,3851	2,0694
³ A:P	2,57	2,46	1,90	1,90	0,0118	0,7816	2,35	2,07	0,2345	0,8035	0,4330

Dentro das linhas, médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta; A:P – Relação Acetato: propionato; EPM – erro padrão da média; BCNF – dieta de baixo CNF; ACNF – dieta de alto CNF;

¹Eq. $y = -0,8339x + 64,789$, $R^2 = 0,873$; ²Eq. $y = 0,6932x + 25,282$, $R^2 = 0,8619$; ³Eq. $y = -0,0858x + 2,5925$, $R^2 = 0,8577$;

Na dieta de alto CNF houve redução do pH, N-NH₃, ácidos graxos de cadeia curta do meio de incubação e da proporção moçar de acetato, em comparação à de baixo CNF. Em contrapartida, houve aumento do butirato ($P = 0,0026$). A proporção molar de propionato não foi afetada pela dieta ($P = 0,3955$), apresentando valor médio de 28,4 mol/100 mol de AGCC (Tabela 5).

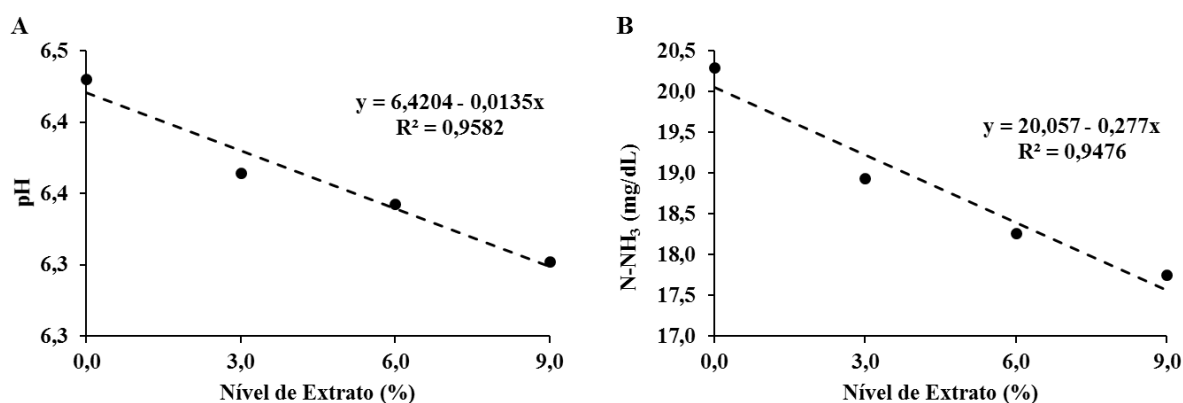


Figura 4 – Valores médios do pH (A) ($P = 0,0001$) e do N-NH₃ (mg/dL) (B) ($P = 0,0002$) em função dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* (0, 3, 6 e 9%).

Houve interação “extrato × hora” ($P = 0,0015$) e “dieta × hora” ($P < 0,0001$) para o pH do meio de incubação. A partir de 12 horas de incubação, o pH do meio de incubação do tratamento com 9% de extrato foi menor que no tratamento controle. Às 48 e 72 horas de incubação, o pH foi menor nos tratamentos com 6 e 9% de extrato em relação ao tratamento controle (Fig. 5A). Com relação à interação “dieta × hora”, verificou-se que a partir de 6 horas de incubação, o pH do meio de incubação na dieta de alto CNF foi menor comparado à de baixo CNF (Fig. 5B).

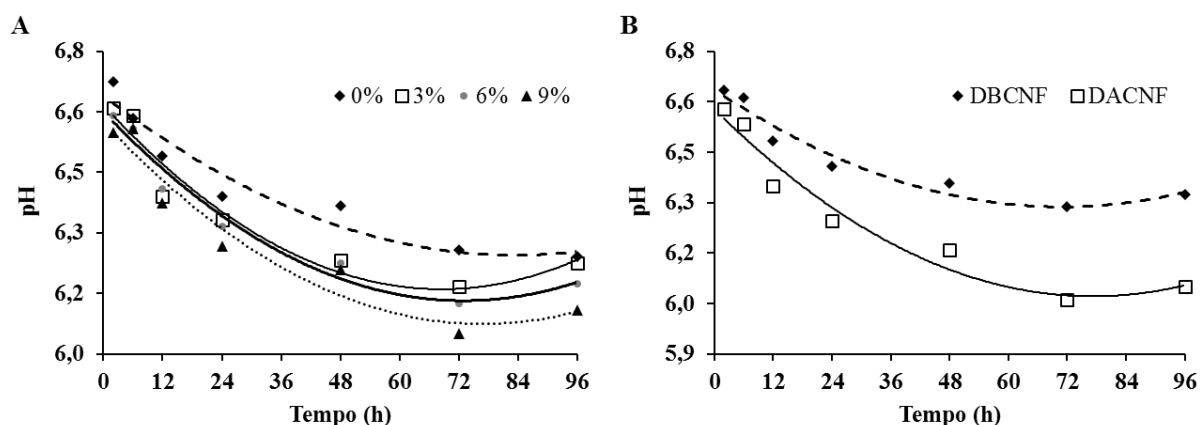


Figura 5 – Interação, “extrato × hora” (A) ($P = 0,0015$) e “dieta × hora” (B) ($P < 0,0001$) para a variável pH.

DBCNF – Dieta de baixo CNF; DACNF – Dieta de alto CNF

Equações Fig. 2A: (0%) $\rightarrow y = 6,6399 - 0,0095x + 0,00006x^2 - R^2 = 0,9344$; (3%) $\rightarrow y = 6,6161 - 0,0133 + 0,0001x^2 - R^2 = 0,943$; (6%) $\rightarrow y = 6,6001 - 0,0128x + 0,00009x^2 - R^2 = 0,9701$; (9%) $\rightarrow y = 6,5744 - 0,013x + 0,00008x^2 - R^2 = 0,9456$; Equações Fig. 2B: (DBCNF) $\rightarrow y = 6,6368 - 0,0099x + 0,00007x^2 - R^2 = 0,9505$; (DACNF) $\rightarrow y = 6,5785 - 0,0144x + 0,00009x^2 - R^2 = 0,9596$;

3.3 PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO*

Não houve interação “extrato × dieta”, para nenhum dos parâmetros de produção de gás avaliados ($P > 0,05$). O extrato vegetal de *P. pyramidalis* não influenciou os parâmetros da cinética de produção de gás ($P > 0,05$). Os valores médios da produção de gás potencial a partir dos carboidratos não fibrosos - Vf_1 , fibrosos - Vf_2 e totais - Vt , em ml/g MS, foram 101,54, 87,37 e 188,91, respectivamente. Por sua vez, a taxa de produção de gás média, em ml/g MS/h, foi de $m_1 = 0,0226$, $m_2 = 0,0735$ e $mt = 0,0961$, para os carboidratos não fibrosos, fibrosos e totais, respectivamente. A lag time (L) média foi de 4,66 horas. As taxas de produção de gás e a lag time foram maiores na dieta de alto CNF comparada à de baixo CNF (Tabela 6).

Tabela 6 – Estimativa dos parâmetros de produção de gás *in vitro* em função dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* e de dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.

Fonte	Parâmetros						
	ml/g MS			ml/g MS/h			h
	Vf_1	Vf_2	Vt	m_1	m_2	mt	L
<i>Extrato</i>							
Cont.	96,28	85,78	182,05	0,0739	0,0222	0,0961	4,72
3%	101,15	86,87	188,02	0,0733	0,0229	0,0962	4,73
6%	103,27	86,47	189,73	0,0744	0,0231	0,0975	4,63
9%	105,46	90,37	195,83	0,0723	0,0223	0,0946	4,56
<i>P - valor</i>							
Linear	0,1186	0,4155	0,1777	0,6312	0,8421	0,7508	0,5212
Quadr	0,7521	0,7041	0,9927	0,6805	0,1864	0,4998	0,8549
<i>Dieta</i>							
60:40	90,40	75,92	166,32	0,070	0,0210	0,0909	4,59
30:70	112,68	98,82	211,50	0,077	0,0243	0,1013	4,73
<i>P - valor</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0290
<i>E x D</i>							
<i>P - valor</i>	0,3975	0,1179	0,8721	0,3676	0,4632	0,3975	0,9788
<i>EPM</i>	6,0393	4,6202	3,7040	0,0035	0,0012	0,0046	0,2177

Vf_1 – produção de gás potencial a partir dos carboidratos não fibrosos; Vf_2 – produção de gás potencial a partir dos carboidratos fibrosos; Vt – produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais; m_1 – taxa de produção de gás dos carboidratos não fibrosos; m_2 – taxa de produção de gás dos carboidratos fibrosos; mt – taxa de produção de gás dos carboidratos totais; L – fase lag; EPM – erro padrão da média.

A adição de extrato de *P. pyramidalis* não afetou a produção cumulativa de gás (ml/g MO) ($P > 0,05$) (Fig. 6A). Entretanto, houve efeito linear crescente ($P = 0,0419$) para a produção de gás média (ml/g MO), em função do aumento do nível de extrato *P. pyramidalis* (Fig. 6B).

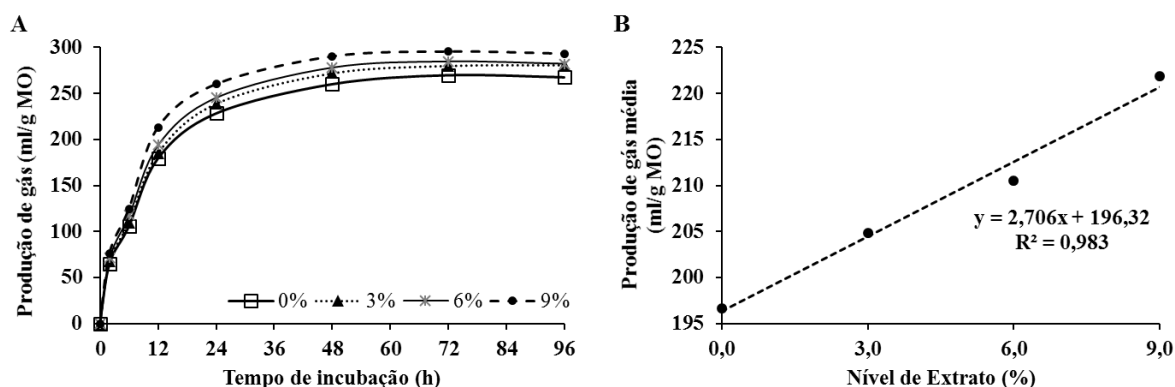


Figura 6 – Produção cumulativa de gás em ml/g de MO (A) e produção média de gás (ml/g MO) (B) ($P = 0,0419$) em função dos níveis de extrato de *P. pyramidalis* (0, 3, 6 e 9%).

4 DISCUSSÃO

Os principais desafios dos sistemas de produção de ruminantes, na atualidade, são reduzir os custos com alimentação, melhorar a qualidade dos produtos e diminuir o impacto da produção no meio ambiente. Assim, a manipulação da fermentação ruminal torna-se um fator crucial para otimizar o processo de fermentação, de modo a melhorar a utilização de nutrientes e a produtividade dos animais (Galmessa et al., 2018).

Nesse sentido, o uso de extratos vegetais surge como uma alternativa importante a ser utilizada na manipulação da fermentação ruminal. Diversos autores têm estudado a ação desses compostos na fermentação ruminal (Busquet et al., 2005; Goel et al., 2008; Spanghero et al., 2008; Sallam et al., 2009; Wang et al., 2009), entretanto, os efeitos são variados e muitas vezes contraditórios, possivelmente devido às diferenças nos extratos vegetais utilizados (Hart et al., 2008).

No presente estudo, diferentes níveis (0, 3, 6 e 9%) de extrato vegetal de *P. pyramidalis* foram usados para avaliar seus efeitos sobre os parâmetros da fermentação ruminal *in vitro* utilizando duas dietas como substrato. Verificou-se que a adição de extrato da *P. pyramidalis* reduziu a degradação da PB às 24 e 48 horas de incubação na dieta com alto CNF, em cerca 13 (Fig. 3-a) e 3,9% (Fig. 3-b), respectivamente (Tabela 4).

A análise de quantificação dos compostos secundários, demonstrou que o extrato da *P. pyramidalis* possui 227,38 mg e 136 mg de equivalente ácido tânico de fenóis totais e taninos totais por grama de extrato seco, respectivamente (Tabela 1). Assim, é possível que tenha ocorrido uma complexação da proteína, presente na dieta, com compostos polifenólicos presentes no extrato, impedindo a degradação da proteína pelos microrganismos ruminais. Essa redução da degradação proteica pode ser benéfica, visto que pode aumentar a eficiência de síntese de proteína microbiana (Getachew et al., 2000; Makkar, 2003), diminuindo o fluxo de nitrogênio amoniacal para o intestino (Sliwinski et al., 2002), além de favorecer a sincronização na liberação dos nutrientes. Contudo, uma incompleta dissociação pós-ruminal de complexos tanino-proteína resultará numa diminuição da absorção de aminoácidos no intestino delgado, diminuindo a digestibilidade aparente total de N (Komolong et al., 2001).

Os mecanismos pelos quais esses complexos são formados, não são totalmente compreendidos (Mueller-Harvey et al., 2018). Contudo, sabe-se que eles têm relação direta com o pH do meio. No rúmen, quando o pH varia de 6,0 – 6,5, a formação de complexos é favorecida e, quando atinge o abomaso (pH < 3,5), o complexo se dissocia, permitindo a ação de peptidases (Leinmüller et al., 1991). Apesar do extrato ter afetando o pH do meio de incubação, reduzindo

de 6,43 no tratamento controle para 6,30 no nível com 9% de extrato, a faixa de pH mantida foi favorável para a formação dos complexos citados acima.

A degradabilidade da fibra em detergente neutro (FDN) na dieta com alto CNF, às 24 horas de incubação, foi reduzida em 5,3% com a adição do extrato de *P. pyramidalis*. Assim como ocorre com a proteína, alguns compostos secundários, principalmente taninos, tendem a reduzir a degradabilidade da fibra por meio da ligação de enzimas bacterianas e da formação de complexos indigestíveis com carboidratos, tornando esses nutrientes inacessíveis aos microrganismos (Schofield et al., 2001). Além disso, a diminuição da degradabilidade da fibra pode ser devido à inibição direta de protozoários, bactérias e fungos ruminais provocada pela presença dos compostos secundários (Patra e Saxena, 2009). A adição de 60 e 90 mg/kg de MS ingerida por ovinos, de extrato de *Quillaja saponária*, reduziu a digestibilidade do FDN em 10,7 e 9,6%, respectivamente (Nasri et al., 2011). Por outro lado, a digestibilidade do FDN foi melhorada em 37,5% quando foi adicionado folhas *Acacia karroo*, rica em taninos condensados, na dieta de caprinos (Brown et al., 2018).

A maior degradabilidade dos nutrientes na dieta com alto CNF já era esperado, uma vez que esta dieta apresentou 2,3 vezes mais CNF (Tabela 2), que são de rápida degradação e, consequentemente, menores teores de FDN, comparado à dieta de baixo CNF. Além de diminuir a degradabilidade da matéria orgânica, dietas com alto teor de FDN, de baixa degradabilidade, pode também diminuir a disponibilidade de N, aprisionando uma proporção considerável de proteínas na matriz da fibra (Tiemann et al., 2008). Contudo, não foi observado diferença significativa ($P = 0,1563$) para a degradabilidade do FDN, às 48 horas de incubação, apresentando valor médio de 586,05 g/kg de MS. É possível que o baixo pH às 48 horas de incubação tenha reduzido, em parte, a ação de microrganismos celulolíticos, visto que de acordo com Van Soest (1994), valores de pH inferiores a 6,2 não só reduz a taxa de digestão como também aumentam o tempo de colonização para a degradação da parede celular.

Adição de extrato de *P. pyramidalis* reduziu, em até 12,52%, a concentração de N-NH₃ no líquido ruminal, variando de 20,29 para 17,75 mg/dL. Esta diminuição pode ser uma consequência da diminuição da degradação da proteína alimentar observada nesse estudo (Tabela 5; Fig. 4-b), resultado da formação de complexos reversíveis com proteínas e / ou inibição da atividade enzimática da protease no rúmen (Patra e Saxena, 2011). Avaliando o efeito de extratos de diferentes plantas sobre a eficiência de utilização de energia e proteína em dietas de ruminantes, Alexander et al. (2008) observaram uma redução de 28% na degradabilidade da PB e de 35% na concentração do N-NH₃, quando avaliou o extrato aquoso de *Picrorhiza kurroa*.

Acredita-se que dois mecanismos distintos sejam responsáveis pelo comprometimento do metabolismo de proteínas no rúmen (Newbold et al., 2004), nos quais o primeiro é a redução da degradação de proteínas em peptídeos (Busquet et al., 2005), e o segundo mecanismo seria a inibição específica de bactérias produtoras de “hiper amônia”, como *Clostridium sticklandii*, *Peptostreptococcus anaerobius* e fungos anaeróbicos (McIntosh et al., 2003). Os valores de N-NH₃, observados neste estudo, mostraram que as condições foram favoráveis para a máxima produção de proteína microbiana, haja vista que de acordo com Leng (1990), concentrações em torno de 10 mg/dL são considerados níveis ótimos de N-NH₃ ruminal.

Conforme observado na tabela 5, a concentração de N-NH₃ foi menor ($P < 0,0001$) na dieta com alto CNF (17,49 mg/dL) em comparação à de baixo CNF (20,13 mg/dL). Assim, pelo fato de apresentar uma maior quantidade de CNF, pode ter havido uma melhor sincronia entre a fermentação dos carboidratos e proteínas da dieta, havendo, portanto, uma maior utilização do N-NH₃ para síntese de proteína microbiana, visto que segundo Nocek e Russell, (1988), a concentração de amônia no rúmen é dependente da degradabilidade da fonte proteica, da disponibilidade de carboidratos e do equilíbrio entre sua produção e utilização pela microbiota. Visando estimar a degradabilidade de proteínas, Raab et al. (1983) mediram a concentração de amônia e a produção de gás às 24 horas, em rações incubadas com diferentes concentrações de carboidratos. Os autores observaram uma redução na concentração de amônia com o aumento da produção de gás, reflexo de um aumento na captação de NH₃ com maiores concentrações de substrato fermentável.

A adição de extrato de *P. pyramidalis* provocou uma mudança nos padrões de produção de AGCC, ocorrendo uma redução na proporção molar de acetato na ordem de 10,5% e um aumento mais acentuado na concentração de propionato, cerca de 21,5%, quando a maior dose de extrato foi utilizada. Essas alterações nas proporções de AGCC podem ser devidas à ação inibitória dos compostos fenólicos do extrato sobre as bactérias ruminais gram-positivas produtoras de acetato (Demirtas, Öztürk e Piskin, 2018). Mirzoeva et al. (1997) observaram que os flavonoides e os ácidos fenólicos reduziram em cerca de 50% o crescimento de bactérias gram-positivas. Da mesma forma, Kim et al. (2015) verificaram que extratos vegetais ricos em flavonoides reduziram o número de populações de bactérias ciliadas e gram-positivas, como *Ruminococcus albus* e *R. flavefaciens*.

Com relação à dieta, era esperado, após 24 horas de incubação, que a dieta com maior concentração de CNF resultasse em uma maior proporção de propionato no meio de incubação, com uma consequente redução na relação A:P, entretanto isso não foi observado. Contudo, a dieta com alto CNF resultou num aumento de 53% na proporção molar de butirato em

comparação à de baixo CNF. Segundo Brossard et al. (2004), dietas concentradas, especialmente as ricas em carboidratos solúveis em água, podem promover o desenvolvimento de protozoários que induzem o aumento do butirato em vez de propionato.

Nesse estudo, os dados de produção de gás foram ajustados usando o modelo logístico bicompartimental de Schofield et al. (1994), sendo gerados os parâmetros de produção de gás e suas respectivas taxas de produção de gás. Conforme observado na figura 5-a, o modelo ajustou-se bem aos diferentes perfis de produção de gás. Assim, observa-se que as curvas de produção de gás apresentaram um padrão sigmoide, formado por uma fase lag inicial (*L*), seguido de um aumento exponencial na produção de gás, até atingir a fase assintótica. Do ponto de vista da avaliação nutricional de dietas, esse modelo apresenta características mais relevantes, comparado a outros modelos, visto que divide a produção de gás de acordo com as taxas de digestão rápida e lenta dos carboidratos (Peripolli et al., 2014).

Com a redução da degradabilidade da proteína bruta e principalmente do FDN, esperava-se uma redução na produção total de gás em função do aumento dos níveis de extrato de *P. pyramidalis*, entretanto, verificou-se um aumento de 12,8% na produção média de gás, variando de 196,7 a 221,9 ml/g de MO (Fig. 5-b). Assim, é possível que esse aumento seja resultado de uma maior fermentação de carboidratos não fibrosos. Sarnataro e Spanghero (2020) atribuiu a diminuição na concentração da amônia ruminal, provocada pela adição de taninos de castanha, ao aumento de bactérias não-celulolíticas, como *P. ruminicola* e *S. ruminantium*, conhecidas por usar amônia para síntese de aminoácidos.

O potencial máximo de produção de gás (*V_t*) médio foi de 188,94 ml/g MS (*P* > 0,05). Sendo que destes, 100,87 ml/g MS é resultado da fermentação dos carboidratos não fibrosos (*V_{f1}*) e o restante (88,07 g/kg MS) é produzido a partir da fermentação dos carboidratos fibrosos (*V_{f2}*). Avaliando o efeito de extrato de *L. leucocephala* e *S. babilônica*, ricos em compostos fenólicos e saponinas, sobre a cinética de produção de gás, Jiménez-Peralta et al. (2011) observaram um aumento de 47 e 68,7%, respectivamente, na produção de gás quando foi adicionado 1,8 ml de extrato / g de MS. Os autores atribuíram esse aumento à melhoria no padrão de fermentação das dietas e, em parte, à habilidade que os microrganismos ruminais tem de degradar esses compostos e utilizá-los como fonte de energia.

A maior parte do gás produzido no rúmen é resultado da fermentação de carboidratos a ácidos graxos de cadeia curta, sendo a fermentação do substrato a acetato e butirato responsável pela maior parcela. Enquanto isso, a fermentação do substrato para o propionato produz gás apenas do tamponamento do ácido, sendo a produção de gás a partir desse ácido graxo relativamente menor (Van Soest, 1994).

A produção total de gás a partir da fermentação da dieta com alto CNF foi maior ($P > 0,0001$) comparado ao gás produzido pela dieta com baixo CNF (211,50 vs 166,32 ml/g MS) (Tabela 6). Esse resultado era esperado, visto que a menor quantidade de carboidratos fibrosos presentes na dieta com alto CNF, favoreceu o aumento na degradabilidade da matéria orgânica.

O tempo de colonização (L), também conhecido como fase lag, foi 3,05% mais rápido na dieta com baixo CNF em comparação à de alto CNF (4,59 vs 4,73 h). O tempo de colonização reflete o grau pelo qual os microrganismos aderem e penetram as barreiras físicas do alimento, de modo a acessar os substratos (Valadares Filho e Pina, 2011). Segundo Tomich et al. (2003), a redução do tempo de colonização é favorecida pela presença de substratos rapidamente fermentáveis, e pelas características físicas e químicas da parede celular. Além disso, essa fase é influenciada diretamente pelo pH ruminal, onde valores de pH menor que 6,2 inibem a taxa de digestão e aumenta a fase lag para a degradação da parede celular (Van Soest, 1994).

5 CONCLUSÕES

A inclusão de extrato de *P. pyramidalis* modificou o padrão de fermentação ruminal, favorecendo a produção de propionato e reduzindo o acetato. O efeito do extrato sobre a degradabilidade da proteína bruta foi mais acentuado na dieta com alta quantidade de carboidratos não fibrosos, observando-se uma redução com o aumento dos níveis de *P. pyramidalis*. A degradabilidade da fibra em detergente neutro foi favorecida até o nível de 4,87% de extrato e, a partir desse nível, reduziu.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, G.; SINGH, B.; SAHOO, A.; BHAT, T. *In vitro* screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.229-244, 2008.
- AOAC (2005). **Official method of Analysis**. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
- ARAÚJO FILHO, J.A., CARVALHO, F.C. **Fenologia e valor nutritivo de espécies lenhosas caducifólias da caatinga. Embrapa Caprinos**. Centro Nacional de Pesquisa, de Caprinos (Comunicado Técnico, 39), Sobral, 1998.
- BAHIA, M.V.; SANTOS, J.B.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Biflavonoids and other phenolics from *Caesalpinia pyramidalis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, p.1402-1405, 2005.
- 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.
- BROSSARD, L.; MARTIN, C.; CHAUCHEYRAS-DURAND, F.; MICHALET-DOREAU, B. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern during latent acidosis in sheep. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.44, p.44-47, 2004.
- BROWN, D.; NG'AMBI, J.W.; NORRIS, D. Effect of tanniniferous *Acacia karroo* leaf meal inclusion level on feed intake, digestibility and live weight gain of goats fed a *Setaria verticillata* grass hay-based diet. **Journal of Applied Animal Research**, p.248-253, 2018.
- 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, p.4393-4404, 2005.
- DEMİRTAŞ, A.; ÖZTÜRK, H.; PİŞKİN, İ. Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation. **Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Ankara**, v.65, p.213-217, 2018.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. **Métodos para análises de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. 214p.
- FERNANDES, R.P.P.; TRINDADE, M.A.; TONIN, F.G. et al. Evaluation of antioxidant capacity of 13 plant extracts by three different methods: cluster analyses applied for selection of the natural extracts with higher antioxidant capacity to replace synthetic antioxidant in lamb burgers. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, p.451-460, 2016.
- FONTELES, N.L.O. (2016). **Prospecção de compostos antioxidantes e lipídicos em carne de caprinos suplementados na caatinga**. Tese. Universidade Federal da Paraíba, Areia-Brasil, 112p.

GALMESSA, U.; FITA, L.; TADESSE, T.; BEKUMA, A. Rumen manipulation: one of the promising strategies to improve livestock productivity - review. **Journal of Dairy & Veterinary Sciences**, v.8, p.1-4, 2018.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. **British Journal of Nutrition**, v.84, p.73-83, 2000.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrient from roughage and concentrate based feeds to methane. **Animal Feed Science and Technology**, v.147, p.72-89, 2008.

GOMES-COPELAND, K.K.P.; LÉDO, A.S.; ALMEIDA, F.T.C. et al. Effect of elicitors in *Poincianella pyramidalis* callus culture in the biflavonoid biosynthesis. **Industrial Crops & Products**, v.126, p.421-425, 2018.

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

JIMÉNEZ-PERALTA, F.S.; SALEM, A.Z.M.; HERNÁNDEZ, P.M. et al. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on *in vitro* gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. **Livestock Science**, v.136, p.192-200, 2011.

KIM, E.T.; GUAN, L.L.; LEE, S.J. et al. Effects of flavonoid-rich plant extracts on *in vitro* ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.28, p.530-537, 2015.

KOMOLONG, M.K.; BARBER, D.G.; McNEILL, D.M. Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels of quebracho tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v.92, p.59-72, 2001.

LAGRANGE, S.; LOBÓN, S.; VILLALBA, J.J. Gas production kinetics and *in vitro* degradability of tannin containing legumes, alfalfa and their mixtures. **Animal Feed Science and Technology**, v.253, p.56-64, 2019.

LEINMÜLLER, E.; STEINGASS, H.; MENKE, K. Tannins in Ruminant feedstuffs. Biannual Collection of Recent German Contributions Concerning Development through. **Animal Research**, v.33, p.9-62, 1991.

LENG, R.A. Factors affecting the utilization of "poor-quality" forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303, 1990.

LEWIS, G.P., **Caesalpinia: A Revision of the Poincianella-Erythrostemon Group**. Royal Botanic Gardens, Kew. 1998.

MAKKAR, H.P.S. Effect and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin rich feeds. **Small Ruminant Research**, v.49, p.241-256, 2003.

- MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Vanillin-HCl method for condensed tannins: Effect of organic solvents used for extraction of tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v.4, p.613-621, 1993.
- MARQUES, R.S.; MONTEIRO, R.P.M.; LEÃO, W.F. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v.35, p.517-522, 2012.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2ª edição, Edições: UFC, Fortaleza – CE, 1997.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semiautomated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuffs evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.
- MENEZES, D.R.; COSTA, R.G.; ARAÚJO, G.G.L. et al. Cinética ruminal de dietas contendo farelo de mamona destoxificado. **Arquivo Brasileiro Medicina veterinária e Zootecnia**, v.67, n.2, p.636-641, 2015.
- McINTOSH, F.M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R. et al. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. **Applied And Environmental Microbiology**, v.69, p.5011-5014, 2003.
- MILIAUSKAS, G.P.; VENSKUTONIS, R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plants. **Food Chemistry**, v.85, p.231-237, 2004.
- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v.152, p.239-246, 1997.
- MUELLER-HARVEY, I.; BEE, G.; DOHME-MEIER, F. et al. Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: Importance of structure, concentration, and diet composition, **Crop Science**, v.59, 2019.
- NASRI, S.; BEN SALEM, H.; VASTA, V. et al. Effect of increasing levels of *Quillaja saponaria* on digestion, growth and meat quality of Barbarine lamb. **Animal Feed Science and Technology**, v.164, p.71-78, 2011.
- 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.
- NOCEK, J.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, p.2070-2107, 1988.
- OLIVEIRA, J.C.S.; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Biflavonoids from the bark roots of *Poincianella pyramidalis* (Fabaceae). **Phytochemistry Letters**, v.16, p.18-22, 2016.
- PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K. et al. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.17-22, 2003.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.363-375, 2009.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannin to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.24-37, 2011.

PAULA, J.E.; ALVES, J.L.H. **897 Madeiras Nativas do Brasil: Anatomia e Dendrologia - Dendrometria - Produção - Uso**, 1. Porto Cinco Continentes, Alegre, p. 438, 2007.

PERIPOLLI, V.; PRATES, E.R.; BARCELLOS, J.O.J. et al. Models for gas production adjustment in ruminant diets containing crude glycerol. **Livestock Research for Rural Development**, v.26, 2014.

QUEIROZ, L.P., 2009. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, p. 467.

RAAB, L.; CAFANTARIS, B.; JILG, L.T.; MENKE, K.H. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.50, p.569-582, 1983.

SALLAM, S.M.A.; BUENO, I.C.S.; BRIGIDE, P. et al. Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* ruminal fermentation and methane production. **Options Méditerranéennes**, n.85, p.267-272, 2009.

SARNATARO, C.; SPANGHERO, M. *In vitro* rumen fermentation of feed substrates added with chestnut tannins or an extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Animal Nutrition Journal**, v.6, p.54-60, 2020.

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.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, p.2980-2991, 1994.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SLIWINSKI, B.; SOLIVA, C.R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.101, p.101-114, 2002.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.

SOUZA, M.F.V.; SILVA, D.A. **Extração, isolamento e reações de caracterização de constituintes químicos**. In: Almeida, R.N. Psicofarmacologia, fundamentos práticos. 1 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ, 2006.

SPANGHERO, M.; ZANFIA, C.; FABBRO, E. et al. Effects of a blend of essential oils on some end products of *in vitro* rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.364-374, 2008.

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, p.185-197, 1994.

TIEMANN, T.T.; LASCANO, C.E.; KREUZER, M.; HESS, H.D. The ruminal degradability of fibre explains part of the low nutritional value and reduced methanogenesis in highly tanniniferous tropical legumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.1794-1803, 2008.

TOMICH, T.R.; GONÇALVES, L.C.; MAURÍCIO, R.M. et al. Composição bromatológica e cinética de fermentação ruminal de híbridos de sorgo com capim-sudão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.747-755, 2003.

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. 616p.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.Ed. London. Constock Publishing Associates, USA, 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. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.63, p.621-629, 2004.

WANG, C.J.; WANG, S.P.; ZHOU, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v.148, p.157-166, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES

As técnicas de produção de gás *in vitro* avaliadas no presente estudo, demonstrou serem importantes ferramentas para avaliar o valor nutricional de alimentos, estimando a digestibilidade e degradabilidade ruminal, permitindo avaliar a cinética de fermentação ruminal, bem como quantificar os produtos finais da fermentação.

A técnica de produção de gás semiautomática utilizada no presente estudo mostrou ser mais acessível para a maioria dos laboratórios, visto que é uma técnica robusta e tem um custo inicial mais baixo comparado à outras técnicas disponíveis. Entretanto, necessita de mais mão de obra para realização de ensaios de produção de gás. Por sua vez, o Ankom^{RF} system, utilizado no estudo, apresenta vantagem em relação aos sistemas manuais pois permite a medição do gás de forma ininterrupta, reduzindo, portanto, a mão de obra para realização dos ensaios. Contudo, além de apresentar um custo inicial mais elevado, esse sistema apresentou diversos problemas antes e durante a execução dos ensaios, como obstrução de válvulas de ventilação, vazamentos de gás e problemas com as baterias, demonstrando a necessidade de manutenção constante dos mesmos. Com isso, é preciso levar em consideração todos estes fatores, antes de escolher qual sistema se adequa melhor às condições do laboratório.

O interesse por metabólitos secundários de plantas (MSPs), como alternativa aos aditivos químicos para ruminantes, tem crescido significativamente nos últimos anos, demonstrando resultados satisfatórios no que diz respeito à modulação da fermentação ruminal.

O interesse por metabólitos secundários de plantas (MSPs), como alternativa aos aditivos químicos para ruminantes, tem crescido significativamente nos últimos anos, demonstrando resultados satisfatórios no que diz respeito à modulação da fermentação ruminal.

Nesse trabalho, o extrato vegetal da catingueira (*Poincianella pyramidalis* Tul.) mostrou ser uma importante alternativa para modular a fermentação ruminal, pois além de diminuir a degradação ruminal da proteína, modificou o padrão de produção de AGCC, diminuindo o acetato e aumentando consideravelmente a produção de propionato no rúmen, indicando alteração na produção de metano entérico.

Esta pesquisa demonstrou a necessidade da realização de mais estudos a partir de extratos de plantas da Caatinga, ricas em metabolitos secundários, utilizados como aditivos em dietas para as diversas espécies de ruminantes, com a finalidade de modular a fermentação entérica e melhorar a eficiência de utilização da energia disponível, mitigar a produção de gases de efeito estufa e, apresentarem potencial poder antioxidante para a saúde animal, e os melhorar a qualidade nutricional da carne e do leite produzido.