



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II - AREIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA**

GABRIELLE DOS SANTOS SILVA

**EFEITO DO EXTRATO DA MALVA BRANCA (*Sida galheirensis* Ulbr) SOBRE A
CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO***

**AREIA
2020**

GABRIELLE DOS SANTOS SILVA

**EFEITO DO EXTRATO DA MALVA BRANCA (*Sida galheirensis* Ulbr) SOBRE
A CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO***

Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia da
Universidade Federal da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros

Coorientador: Dr. Juraci Marcos Alves Suassuna

**AREIA
2020**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586e Silva, Gabrielle Dos Santos.

Efeito do extrato da malva branca (*Sida galheirensis* Ulbr) sobre a cinética de produção de gás *in vitro* / Gabrielle Dos Santos Silva. - Areia, 2020.
39 f. : il.

Orientador: Ariosvaldo Nunes de Medeiros.
Coorientador: Juraci Marcos Alves Suassuna.
Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Degradabilidade. 2. Fermentação ruminal.
3. Metabólitos secundários. 4. Rúmen. I.
Medeiros, Ariosvaldo Nunes de. II. Suassuna,
Juraci Marcos Alves. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

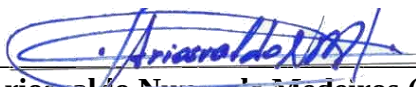
GABRIELLE DOS SANTOS SILVA

**EFEITO DO EXTRATO DA MALVA BRANCA (*Sida galheirensis* Ulbr) SOBRE
A CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS *IN VITRO***

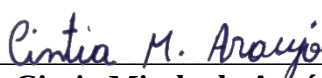
Trabalho de Conclusão de Curso em Zootecnia da
Universidade Federal da Paraíba, como requisito
parcial à obtenção do título de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em: 27/04/2020

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ariosvaldo Nunes de Medeiros (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba



Msc. Cintia Mirely de Araújo
Universidade Federal da Paraíba



Dra. Beatriz Dantas de Oliveira Fernandes
Universidade Federal da Paraíba

A Deus, por me permitir a dádiva de viver, e por me permitir encontrar uma profissão tão bela quanto a zootecnia, sempre me gerando oportunidades que nem sei dizer se sou digna e, principalmente, pelo sustento nos momentos difíceis.

As pessoas que mais amo neste mundo, a minha família que por mais relutante em me ver sair de casa para ir atrás de um sonho me apoiou e esteve comigo até o fim, mesmo nas horas mais duras.

Especialmente a minha mãe e eterna professora, Maria Conceição, por me ajudar e me guiar neste caminho e me ajudar a ser firme com os seus conselhos. Por entender meus motivos de sair de casa e apoiá-los. Por simplesmente ser o maior exemplo que eu poderia ter em minha vida.

A minha querida vó, Dona Guiomar, que por maior que fosse a saudade entendia a necessidade da minha ausência e sempre orou e rezou por mim, para que eu tivesse garra e perseverança para continuar.

Aos meus irmãozinhos, Maria Clara e Sérgio Gabriel, por me fazerem ser uma pessoa melhor e me fazerem esquecer dos problemas olhando para estes sorrisos tão lindos e inocentes.

A meu pai, Ailton, que a seu modo sempre me apoiou mesmo distante. Pelo incentivo a sempre buscar o que quero com muita luta e esforço.

Ao meu namorado, Túlio Araújo, pelo seu companheirismo, pela fé que tem na minha capacidade e por todo seu apoio e carinho. Por acreditar neste trabalho quase tanto quanto eu, por me apoiar acima de tudo dormindo no laboratório para me ajudar nas minhas análises quando estava sozinha. Espero poder retribuir o suficiente tudo o que você tem feito por mim.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão do estímulo financeiro para a realização desta pesquisa. À Universidade Federal da Paraíba pela oportunidade de aprender e me capacitar como profissional nesta profissão excepcional.

Ao meu orientador, Prof. Ariosvaldo Nunes de Medeiros, pelo profissional dedicado e ético que é. Sou grata principalmente pela oportunidade dada ainda na minha primeira semana no curso de zootecnia e de ser integrada no setor de caprinocultura, que me possibilitou a abertura de tantas outras portas de aprendizado, com cada experiência nova e conhecimento adquirido.

Ao meu coorientador, Juraci Marcos, por toda a dedicação e paciência, sempre mantida com o bom humor. É muito louvável a capacidade de se manter tranquilo em momentos de tribulação, esta é uma das suas características que gostaria de levar para a vida.

À banca examinadora composta por Beatriz Dantas, um exemplo de mulher e profissional, pela garra e determinação, sem nunca desanimar diante dos problemas, pela serenidade e sapiência em aconselhar e orientar; Cíntia Mirely, uma profissional excepcionalmente dedicada, que muito contribuiu para a realização deste projeto e para a minha trajetória no curso, responsável por me fazer me apaixonar ainda mais por esta profissão e pela ciência; Luana Magna, como suplente, uma pessoa de luz que tive o prazer de acompanhar parte da sua trajetória para que pudesse usar como espelho, sempre tão serena, muito boa com as palavras e solícita acima de tudo.

Aos professores do curso de graduação em zootecnia pelos ensinamentos passados e pelo grande aprendizado. Especialmente aos professores Edilson Saraiva, professor que me apresentou a zootecnia ainda no primeiro período na condição de coordenador do curso juntamente com a professora Aline Rufino que, além de serem exemplos de profissionais, são exemplos também de conduta e de seres humanos.

Ao grupo de estudos Nutriaridus, o grupo de estudos pelo qual fui acolhida desde o primeiro período, onde conheci tantas pessoas incríveis e aprendi tanto que é difícil mensurar. Cada um contribuiu para a minha formação da sua maneira Alice Rocha, Angélica soares, Marina Hipólito, Felipe José, Joederson, Francinilda Sousa e, aos companheiros de experimento Alidiel Félix e Júlio Delfino.

Agradeço a duas zootecnistas em especial que, cada uma à sua maneira, me inspiram em como seguir meu caminho com garra e perseverança. A Alenice Ramos, pela sua capacidade de ensinar algo complexo de forma simples, e pela presença ao falar, me

inspiro em você sempre que preciso falar em público. A Anaiane Pereira, pela sua singularidade harmônica, tão inteligente e de feitos extraordinários, mas também é dona de uma simplicidade e simpatia sem igual.

Aos Funcionários do Laboratório de análise de alimentos e nutrição animal – LAANA, Antônio Costa (*in memorian*), Antônio Gonçalves (Duelo) e José Sales; do setor de caprinocultura Paulo Henrique, Josinaldo Ursulino (Índio) e Jorge Vieira (Boi), e de São João do Cariri José Moraes, Netinho e, principalmente, Marciane que muito contribuíram na minha trajetória aos quais tenho muito carinho e respeito, por toda a paciência e por tudo que aprendi.

A minha turma 2015.2 por todos os momentos de muita troca e aprendizado. Agradeço especialmente aos sobreviventes: Camila Pamplona, Letícia Nascimento, Taynã Cássia, Karoline Sistêlos, Nerianne Lima, Paulo Azevedo, José Wellington, Brian Trevas e Joakson Alves, pelos momentos de descontração, principalmente. E a turma do ensino médio Aline, Aron, Ezielton, Jeferson, Sérgio e Victória vocês são o bando de loucos que sempre vão estar no meu coração.

Agradeço especialmente, a Carolina Cavalcanti e Victória Andrade, minhas amigas de infância que sinto tanta saudade e um carinho mais que especial por estas duas. A minha grande amiga Camila Pamplona, um presente da zootecnia, que entre trancos e barrancos permanecemos firmes e fortes até o fim. Uma amizade que começou no início do curso e hoje dividimos tudo uma da outra. Espero que esta seja apenas uma de muitas conquistas que compartilhamos.

A minha família que por mais relutante em me ver sair de casa para ir atrás de um sonho me apoiou e esteve comigo até o fim, mesmo nas horas mais duras. A compreensão da minha mãe, Maria Conceição, minha vó, Dona Guia e meus irmãos Maria Clara e Sérgio Gabriel, ainda tão pequeninhos quando comecei essa jornada. E ao meu pai que da sua maneira sempre me apoiou. Obrigada por estarem do meu lado sempre, jamais conseguirei agradecer o suficiente, nem tampouco retribuir.

Ao meu amigo, companheiro e namorado, Túlio Araújo que esteve comigo e me apoiou, acreditou em mim quando nem mesmo eu acreditava, reascendia minha fé, me confortava com seu abraço e comemorava meus acertos como se fossem seus. Sou grata a Deus por ter você comigo nestes momentos difíceis.

Agradeço também imensamente a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão desta etapa.

Meus sinceros agradecimentos!

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento”
Frederick Herzberg.

“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin.

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, para fazer melhor ainda!”
Mário Sérgio Cortella.

RESUMO

A Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, apresenta uma grande diversidade de plantas que podem ser utilizadas na alimentação animal. Grande parte dessas espécies vegetais se caracterizam por apresentar diferentes tipos de compostos secundários, que podem ser explorados como aditivos naturais a serem utilizados na alimentação de ruminantes, seja quando fornecido através do consumo direto das plantas forrageiras, ou quando fornecidos na forma de extrato. Assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do extrato da *Sida galheirensis* Ulbr sobre a cinética de produção de gás e a degradabilidade dos nutrientes *in vitro*. O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, com três níveis de inclusão de extrato [0, 6 e 12% da matéria seca (MS)], e quatro repetições, sendo os blocos representados por três ensaios. Foram determinados, o perfil fitoquímico do extrato da *S. galheirensis*, a estimativa dos parâmetros da cinética de produção de gás, os parâmetros ruminais e a degradabilidade da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta. A produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais (V_t) e carboidratos não fibrosos (V_{f1}) aumentou com a inclusão do extrato da *S. galheirensis*. Contudo, a produção de gás oriunda da fermentação dos carboidratos fibrosos (V_{f2}) e as taxas de produção de gás não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos. A *lag time* (L) foi reduzida ($P < 0,0001$) com a inclusão do extrato. O pH do meio de incubação reduziu com o aumento dos níveis de extrato de *S. galheirensis* ($P < 0,0001$). A concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) não diferiu entre os tratamentos ($P = 0,4995$), apresentando valor médio de 42,73 mg/dL. As degradabilidades da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO) e da proteína bruta (DPB) foram significativamente superiores na dieta controle em comparação aos níveis de extrato de 6 e 12%. A adição de 6% de extrato de *S. galheirensis* foi suficiente para modular a fermentação ruminal, aumentando a produção de gás e reduzindo a degradabilidade dos nutrientes.

Palavras - chave: Degradabilidade. Fermentação ruminal. Metabólitos secundários. Rúmen.

ABSTRACT

Caatinga is an exclusive Brazilian biome and has a great diversity of plants that can be used in animal feeding. A large part of these plant species is characterized by presenting different types of secondary compounds, which can be exploited as natural additives to be used in the feeding of ruminants, either when supplied through the direct consumption of forage plants or supplied as an extract. Thus, our objective of this study was to evaluate the effect of *Sida galheirensis* Ulbr extract on the gas production kinetics and the degradability of nutrients *in vitro*. The experimental design adopted was randomized blocks, with three levels of extract inclusion [0, 6 and 12% of dry matter (DM)], and four repetitions, with the blocks represented by three tests. Were determined: the phytochemical profile of *S. galheirensis*, the estimation of the gas production kinetics parameters, the ruminal parameters, and the degradability of dry matter, organic matter, and crude protein. The gas production potential from total carbohydrates (V_t) and non-fibrous carbohydrates (V_{f1}) increased with the inclusion of *Sida galheirensis* extract. However, gas production from fermentation of fibrous carbohydrates (V_{f2}) and gas production rates did not differ ($P > 0.05$) between treatments. The lag time or lag phase (L) was reduced ($P < 0.0001$) with the inclusion of the extract. The pH of the incubation medium decreased with increasing levels of *S. galheirensis* extract ($P < 0.0001$). The concentration of rumen ammoniacal nitrogen (NAR) did not differ between treatments ($P = 0.4995$), with an average value of 42.73 mg/dL. Dry matter (DMD), organic matter (OMD) and crude protein (CPD) degradability were significantly higher in the control diet compared to extract levels of 6 and 12%. The addition of 6% *S. galheirensis* extract was enough to modulate rumen fermentation, increasing gas production, and reducing nutrient degradability.

Keywords: Degradability. Ruminal fermentation. Rumen. Secondary metabolites.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química dos ingredientes e das rações experimentais	25
Tabela 2 - Screening fitoquímico do extrato etanólico e quantificação dos compostos secundários da <i>Sida galheirensis</i> Ulbr.....	30
Tabela 3 - Estimativa dos parâmetros de produção de gás <i>in vitro</i> em função dos níveis de extrato da <i>Sida galheirensis</i> Ulbr.....	31
Tabela 4 - Parâmetros ruminais e degradabilidade dos nutrientes às 48 horas de incubação em função dos níveis de extrato da <i>Sida galheirensis</i> Ulbr	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Rotaevaporador modelo R-210.....	23
Figura 2 - Sistema semiautomático de produção de gás <i>in vitro</i>	25
Figura 3 - (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.....	27
Figura 4 - Produção cumulativa de gás (ml) em função dos níveis de extrato da <i>Sida galheirensis</i> Ulbr	33

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

CF – Carboidratos Fibrosos

CH₄ – Gás Metano

CNF – Carboidrato Não Fibroso

CO₂ – Dióxido de Carbono

DMO – Degradabilidade da Matéria Orgânica

DMS – Degradabilidade da Matéria Seca

DPB – Degradabilidade da Proteína Bruta

H₂ – Hidrogênio

L – *Lag time*

m1 – Taxa de produção de gás a partir dos carboidratos não fibrosos

m2 – Taxa de produção de gás a partir dos carboidratos fibrosos

MS – Matéria Seca

mt – Taxa de produção de gás a partir dos carboidratos totais

NAR – Nitrogênio Amoniacal Ruminal

PB – Proteína Bruta

pH – Potencial de Hidrogênio

Vf₁ – Produção de gás potencial a partir dos carboidratos não fibrosos

Vf₂ – Produção de gás potencial a partir dos carboidratos fibrosos

Vt – Produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	15
2.2 MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA RUMINAL.....	16
2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	17
2.4 EFEITOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 COLHEITA DA PLANTA.....	22
3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO.....	22
3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS.....	23
3.3.1 Polifenóis Totais.....	23
3.3.2 Taninos Totais.....	24
3.3.3 Flavonoides Totais.....	24
3.3.4 Dieta Experimental.....	24
3.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS E DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i>	25
3.4.1 Animais doadores.....	25
3.4.2 Preparo do meio de incubação.....	26
3.4.3 Preparação do inóculo microbiano.....	26
3.4.4 Níveis testados e diluição dos extratos.....	26
3.4.5 Preparo dos frascos de incubação.....	27
3.4.6 Estimativa dos parâmetros cinéticos de produção de gás.....	27
3.4.7 Degradabilidade dos nutrientes.....	28
3.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS RUMINAIS.....	28
3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A Caatinga é um dos biomas com maior diversidade de espécies vegetais, onde cerca de 70% dessas espécies apresentam potencial para serem utilizadas na alimentação animal. Além disso, grande parte dessas espécies são ricas em metabólitos secundários, que são compostos orgânicos presentes em raízes, caules, folhas e flores das plantas e seus extratos, os quais não estão relacionados diretamente ao crescimento e desenvolvimento, mas que são essenciais à sobrevivência da planta.

Os metabólitos secundários podem apresentar potencial de ação relevante sobre a modulação da fermentação ruminal (SILVA, 2013). Isso se deve principalmente à capacidade que essas substâncias têm de interagir com a microbiota ruminal e os produtos finais da fermentação (JAFARI et al., 2019). Tendo como principais representantes os compostos fenólicos, saponinas e os óleos essenciais, essas substâncias têm sido bastante estudadas com o intuito de contribuir para o aumento da eficiência da utilização dos nutrientes pelos ruminantes e, conseqüentemente, melhorar o desempenho animal (BODAS et al., 2012).

A *Sida galherensis* Ulbr, conhecida popularmente como Malva Branca, pertencente à família Malvaceae, é uma espécie bastante presente na vegetação da Caatinga. Trabalhos tem mostrado que a *S. galherensis* é rica em compostos como terpenos, flavonas, feoftinas, entre outros (SILVA et al, 2006). Entretanto, a presença, em altas concentrações, desses metabólitos secundários, associado aos altos níveis de fibra, são, muitas vezes, considerados importantes fatores limitantes da utilização dessas plantas na alimentação animal (CALABRÒ, 2015).

Estudos revelam ainda que essa espécie possui elevada atividade antioxidante, devido a presença de compostos fenólicos ($57,5 \pm 2,47$ mg de equivalente ácido gálico /g MS), dentre eles teores consideráveis de taninos ($52,6 \pm 7,28$ mg equivalente ácido tânico/g MS) e flavonoides em sua composição ($29,7 \pm 2,41$ mg de equivalente catequina/g MS) (FONTELES, 2016; SILVA et al., 2006). Estes compostos podem trazer alterações nos produtos fermentativos pela sua interação com a microbiota ruminal, geralmente, infiltrando-se na membrana celular levando a sua desconstituição, selecionando grupos específicos e assim alterando as concentrações dos produtos finais da fermentação ruminal (FERNANDES, 2018).

Sendo assim, métodos de avaliação de alimentos que possibilitam avaliar a dinâmica da digestão são de grande interesse na nutrição de ruminantes, pois simulam os processos que ocorrem no rúmen, tanto no que diz respeito ao desaparecimento do

substrato quanto no aparecimento dos produtos fermentativos, como os gases (CO_2 e CH_4), os AGCC's, amônia (NH_3) e biomassa microbiana, além disso permite avaliar como a dieta pode interferir nestes produtos (MAKKAR et al., 1995).

A identificação dos metabólitos secundários presentes no extrato da *S. galheirensis* e suas concentrações precisa ser esclarecida, para que se possa elaborar estratégias nutricionais para ruminantes. Diante do exposto, objetivou-se com o presente estudo avaliar o efeito do extrato de malva (*Sida galheirensis* Ulbr) sobre a cinética de produção de gás e a degradabilidade dos nutrientes *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERMENTAÇÃO RUMINAL

O sucesso evolutivo dos ruminantes se deu graças ao desenvolvimento de modificações anotomofisiológicas que permitiram a utilização de carboidratos estruturais de forma eficiente, através de uma câmara fermentativa que possibilita a fermentação pré-gástrica (BERCHIELLI, 2006).

Esta câmara fermentativa é o rúmen, um ecossistema completo, rico em bactérias, fungos e protozoários flagelados e ciliados que promovem a fermentação do alimento (substrato), que chega via ingestão, convertendo-o em ácidos graxos de cadeia curta, proteína microbiana, vitaminas do complexo B e K, metano, dióxido de carbono, amônia, nitrato, etc. (VALADARES FILHO et al., 2006). Sendo os principais produtos da fermentação ruminal os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que representam entre 60 a 80% da energia metabolizável do ruminante (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

As condições ruminais oferecidas pelo animal, como a remoção dos produtos fermentativos, o tamponamento ruminal para manutenção do pH, temperatura, anaerobiose, etc., são de extrema importância para a manutenção da microbiota ruminal (MORAIS et al., 2006). Entretanto, o número e a proporção relativa das diferentes populações microbianas, sofrem influência direta da quantidade e composição da dieta, principalmente, quanto ao tipo de alimento ingerido e do potencial fermentativo da fibra (OLIVEIRA et al., 2013; DILORENZO et al., 2006).

Desta forma, o conceito de manipulação ruminal com aditivos alimentares vem se popularizando cada vez mais na produção de ruminantes, e tem sido o foco de inúmeras pesquisas científicas (RANGEL et al., 2008; PEDREIRA et al., 2005; RIVERA et al., 2010) buscando a mitigação do metano produzido, principalmente o oriundo das bactérias metanogênicas e alguns protozoários ciliados entre os microrganismos e a utilização de alguns aditivos como ferramenta moduladora da fermentação ruminal, como monensina, ácidos graxos poli-insaturados e aminoácidos.

Alguns grupos específicos de microrganismos, como as bactérias gram positivas, as bactérias produtoras de hidrogênio, alguns protozoários ciliados e as archeas (bactérias metanogênicas) podem estimular a metanogênese ou ainda, proporcionam a desaminação excessiva de aminoácidos. A inibição destes grupos pode trazer benefícios significativos para o desempenho e eficiência produtiva do animal, principalmente pela redução de perdas energéticas pelo carbono desprendido na forma de metano (KOZLOSKI, 2009; OLIVEIRA, 2013).

2.2 MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA RUMINAL

O rápido crescimento da população mundial tem aumentado consideravelmente a demanda por proteína de origem animal. Com isso, para que esta demanda não exceda a capacidade de produção dos sistemas, faz-se necessário encontrar alternativas capazes de aumentar a eficiência produtiva dos rebanhos (RANGEL et al., 2008).

Desta forma, diversos pesquisadores têm buscado ferramentas de manipulação ruminal para melhorar a eficiência da fermentação ruminal, com a finalidade de reduzir a ocorrência de enfermidades, aumentar a produção de propionato e, ao mesmo tempo, reduzir os processos que representam perdas energéticas para o animal como a metanogênese, a proteólise e desaminação das proteínas dietéticas no rúmen (LONGO et al., 2007; SALMAN et al., 2006).

Dentro desta ótica, vinha se utilizando de promotores de crescimento, com o objetivo de aumentar a eficiência produtiva dos animais, a exemplo dos anabólicos e antibióticos, como a bacitracina e eritromicina, ou ionóforos (RANGEL et al., 2008; MORAIS et al., 2006) que são substâncias capazes de interagir com íons e cátions podendo atuar regulando o balanço químico entre o meio interno e externo das bactérias ruminais, podendo alterar a sua osmolaridade, que por sua vez, na tentativa de manter sua homeostase utiliza sua energia de forma excessiva, deprimindo suas reservas, retardando ou impossibilitando a sua reprodução, trazendo efeito bactericida ou bacteriostático (RUSSEL e STROBEL, 1989; OLIVEIRA, 2013).

As bactérias gram positivas são mais sensíveis a este efeito que as bactérias gram negativas, principalmente devido suas diferenças na parede celular. Assim, as bactérias gram negativas possuem uma parede celular com dupla camada de membrana plasmática ligadas por uma camada de glicopeptídeos, enquanto as bactérias gram positivas possuem uma membrana externa mais simples dotada apenas de uma espessa camada glicopeptídica (KOZLOSKI, 2016). Sendo as bactérias gram positivas em sua maioria celulolíticas e produtoras de ácido acético, butírico, láctico, H₂ e metano, logo as gram negativas, em sua maioria produtoras de ácido propiônico, são mais resistentes devido a maior proteção externa (BODAS et al., 2012; RUSSEL e STROBEL, 1989).

Desta forma, estes mecanismos são responsáveis pela modificação das proporções de AGCCs no rúmen, reduzindo a produção de acetato, butirato e metano e aumentando a produção de propionato e, conseqüentemente, a disponibilidade de glicose para o animal, melhorando seu balanço energético e possibilitando maiores produções de leite e carne. Além de controlar o pH através da redução do lactato e prevenir a ocorrência de

enfermidades metabólicas como a acidose ruminal (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004; MORAIS et al., 2006; OLIVEIRA, 2013).

Entretanto, nos últimos anos o mercado consumidor tem se mostrado cada vez mais preocupado com a qualidade e procedência dos produtos, principalmente quanto a segurança alimentar. Neste sentido, em 2003 o uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação animal foi proibido na União Europeia (1831/2003; European Council, 2003) em detrimento do risco à saúde pública quanto a resistência bacteriana e ao risco de intoxicação dos animais (JAFARI et al., 2019; OH et al., 2017).

Com isso, tem se buscado substâncias alternativas que possam apresentar mecanismos de ação semelhante aos ionóforos, sem apresentar, no entanto, riscos à saúde pública. Neste sentido inúmeros estudos têm sido realizados buscando formas alternativas que possam ser utilizadas na manipulação ruminal (SARAIVA et al., 2015). Em estudo comparando o efeito do extrato de própolis e da monensina sódica sobre a fermentação ruminal de bovinos, Oliveira (2005) encontrou que a própolis é ainda mais eficiente em reduzir o teor de amônia no rúmen que a monensina, trazendo outros benefícios, como aumentar o desempenho e eficiência alimentar de bovinos.

Spanghero et al. (2008) testando diferentes níveis de inclusão de misturas de óleos essenciais advindo de diversas plantas em vacas leiteiras e touros de engorda observaram que houve mudança moderada nos produtos finais da fermentação, indicando que houve toxicidade seletiva contra cepas que crescem em pH mais baixo. Além de promover aumento nas concentrações de propionato.

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os vegetais produzem uma gama de compostos orgânicos que não possuem função direta no seu crescimento e desenvolvimento (JAFARI et al., 2019). Estes compostos são conhecidos como metabólitos secundários, produtos secundários que atuam como agente na competição planta-planta e simbioses plantas-microrganismos e se diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, carboidratos, nucleotídeos e lipídeos), pois sua distribuição é restrita ao reino vegetal (MACÊDO et al., 2018; SARAIVA et al., 2015). Podem agir como atrativos para animais polinizadores, por seu odor, cor ou sabor, e ainda, podem repelir herbívoros evitando a predação ou atuar contra infecção por microrganismos patogênicos (SARAIVA et al., 2018).

As principais classes de metabólitos secundários são os terpenos, os compostos fenólicos e compostos nitrogenados, onde dentre estes grupos mais de 200.000 estruturas já foram identificadas (JAFARI et al., 2019; MACÊDO et al., 2018).

Os terpenos constituem a maior classe de metabólitos secundários, podendo apresentar funções variadas dentro do vegetal, agindo como fito hormônios, atuando no crescimento e desenvolvimento da parte aérea das plantas como giberelinas, ácido abscísico e esteróis (MORAIS et al., 2006). A maioria dos terpenos são insolúveis em água, tornando-se distintos inseticidas como as saponinas, com ação detergente e emulsificante e os óleos essenciais com seu poder de inibir a ovoposição dos parasitas (BODAS et al., 2012).

As saponinas são apontadas como potenciais agentes moduladores ruminais por serem inibidores do crescimento de protozoários ruminais, conhecido como defaunação, podendo aumentar a síntese de proteína microbiana e, conseqüentemente, maior disponibilidade de proteína no intestino (BERCHIELLE, 2006). É um grupo bastante diversificado de glicosídeos amplamente distribuído no reino vegetal, que podem promover a redução da metanogênese via defaunação ou agir diretamente na atividade das bactérias através de alterações na permeabilidade da membrana destas células (PATRA e SAXENA, 2009).

Já os óleos essenciais são conhecidos por serem voláteis e podem ser de origem terpenoica ou não (JAFARI et al., 2019). De forma geral, podem ser constituídas por grandes ou pequenas moléculas de hidrocarboneto e seus derivados oxigenados. No seu nome já carrega sua principal característica a essência, por serem compostos tão voláteis são capazes de exalar fragrâncias (PATRA, 2011). Segundo Bodas et al. (2012), alguns estudos têm ligado o efeito dos óleos essenciais com defaunação devido a sua natureza lipofílica, havendo maior facilidade de permear a membrana protozoária. De forma semelhante acontece com as bactérias gram positivas, além de serem capazes de suprimir a capacidade de colonização e digestão dos substratos.

Os compostos fenólicos representam o grupo mais diversificado, contendo mais de 10.000 compostos diferentes. Caracterizam-se por possuir um grupo fenol, ou seja, uma hidroxila funcional em um anel aromático (JAFARI et al., 2019). São conhecidos por agirem na defesa da planta, seja contra herbívoros ou patógenos, no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores e dispersores de frutos, proteção contra radiação e ainda podem causar alelopatia (inibição do crescimento de plantas competidoras), sendo a

lignina, os taninos e os flavonoides os seus principais representantes (CORDÃO et al., 2010).

Os taninos são substâncias extremamente versáteis e de estruturas muito variadas, formadas por moléculas contendo polifenóis com pesos e grau de complexidade variada (MACÊDO et al., 2018). Eles são divididos em 2 grupos principais: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são compostos por moléculas de menor grau de complexidade. Por sua vez, os taninos condensados, apresentam estruturas mais complexas contendo um grupo fenólico-hidroxil, permitindo assim a formação de complexos com outras moléculas, principalmente proteínas e em menor grau com íons metálicos, aminoácidos e polissacarídeos (CORDÃO et al., 2010). Os taninos podem apresentar efeitos benéficos e maléficos na nutrição de ruminantes, dependendo de quanto é consumido, da sua composição e do seu peso molecular (FRUTOS et al., 2004).

Medjekal et al. (2017) trabalhando com *Nigella sativa* observaram uma redução de 20% no metano, que foi atribuído ao efeito antimetanogênico dos taninos pelas alterações causadas na membrana celular das arqueas metanogênicas, ou provavelmente do efeito das saponinas sobre as populações de protozoários.

Os compostos nitrogenados também são um grupo bastante vasto, estando entre os principais representantes os alcaloides, os glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não proteicos, sendo que a maioria destes compostos são considerados tóxicos para ruminantes, devido sua alta eficiência nas respostas de defesa contra insetos e herbívoros (CALABRÓ, 2015).

2.4 EFEITOS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL

A procura por alimentos e aditivos alimentares na dieta de ruminantes que possam suprir as necessidades dos animais mantendo a sua máxima eficiência é cada vez maior, especialmente em ambientes desafiadores como o semiárido, onde a sazonalidade dos alimentos dificulta a nutrição adequada dos animais ao longo do ano (SILVA, 2013).

Em estudo com plantas taníferas Longo et al. (2007) observaram uma redução na emissão de metano de 17% quando utilizaram leguminosas como a leucena e uma maior massa microbiana e diferentes proporções de AGCC sugerindo uma maior produção de ATP por diferentes rotas metabólicas. Já Oh et al (2017) utilizando o extrato de ginkgo observaram redução de metano em 53% sem afetar a produção total de AGCC, entretanto proporcionando redução de acetato e aumento de propionato. Além da redução na

população de protozoários, fungos, metanogênicas e bactérias produtoras de hidrogênio enquanto que a população de bactérias produtoras de propionato aumentou.

Com isso, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas a fim de propiciar alimentos de qualidade que garantam a eficiência de produção dos animais para que possa suprir a demanda de consumidores que aumenta a cada instante. Desta forma, os metabólitos secundários vêm sendo estudados como uma forma de modular os produtos produzidos na fermentação ruminal, para que os nutrientes sejam melhor absorvidos ao passo em que, menos metano é emitido (JAFARI et al., 2019). A fermentação ruminal é realizada por microrganismos tais como bactérias, fungos e protozoários, os quais degradam os nutrientes oferecidos na dieta a ácidos graxos de cadeia curta, além da síntese de proteína microbiana para atender a demanda animal (FONTELES, 2016).

Grande parte dos compostos secundários oferece proteção antimicrobiana às plantas, onde provavelmente atuam se infiltrando na membrana celular levando a sua desconstituição, ocasionado uma perda de íons. Um dos principais compostos que tem este potencial é o tanino, especialmente os de menor peso molecular (BODAS et al., 2012).

Os taninos têm a capacidade de se aderir a partículas do substrato, especialmente, proteínas, protegendo estas partículas da degradação microbiana. Ao formar complexos com proteínas, essas substâncias protegem estes nutrientes da degradação microbiana, evitando que seja utilizada como fonte de energia e ocorra uma redução nos processos de desaminação de aminoácidos, gerando uma menor produção do nitrogênio amoniacal ruminal, resultando por sua vez em uma maior concentração de proteína disponível no intestino (BODAS et al., 2012). Por conta disso, com a menor quantidade de substrato há uma menor produção de hidrogênio e com isso, uma consequente redução na produção de metano (JAFARI et al., 2019; FONTELES, 2016).

Entretanto, dependendo da concentração ingerida de tanino os efeitos da complexação com proteínas e outras macromoléculas podem ser benéficos ou adversos ao trato gastrointestinal. Segundo Cannas (2005), os taninos estão associados com a redução da ingestão de matéria seca e digestão de proteínas, fibra e da digestibilidade da matéria orgânica. Além de que por não serem absorvidos podem se complexar a macromoléculas, causando danos a mucosa do trato gastrointestinal (CORDÃO et al., 2010).

Assim como os taninos, os óleos essenciais possuem a capacidade de modificar a permeabilidade da membrana além de serem de alta toxicidade a algumas cepas de

bactérias, especialmente as gram negativas (MACÊDO et al., 2018). O principal mecanismo de ação dos óleos é a inibição da ligação bacteriana às partículas alimentares e, conseqüentemente, resultando na menor produção de nitrogênio amoniacal. Tem sido proposto que a presença de óleos essenciais na dieta pode reduzir a ação de bactérias metanogênicas sem reduzir a produção total de AGCC (PATRA, 2011).

As saponinas também são capazes de promover alterações na membrana plasmática das células bacterianas, especialmente sobre as gram positivas, por não possuírem camada extracelular de proteção, como as gram negativas, tornando-as mais susceptíveis (JAFARI et al., 2019). Geralmente, a sua presença na dieta está associada à redução na população de protozoários e com isso a um aumento na população de bactérias celulolíticas e ainda, ao aumento na concentração de propionato, bem como a redução da concentração de nitrogênio amoniacal ruminal e da atividade metagenômica (CALABRÓ, 2015; PATRA e SAXENA, 2009).

3 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, localizado em 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).

3.1 COLHEITA DA PLANTA

Para realização do estudo, foram coletados folhas, flores e botões florais da *Sida galheirensis* Ulbr, em uma área de Caatinga no município de Pesqueira – PE. A espécie coletada foi identificada, colocada em exsicata 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 plantas foram transportadas ao LAANA/CCA/UFPB, pré-secas em estufa de circulação forçada de ar ($\pm 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) e moídas em moinho de faca tipo Willey (Modelo MA 580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil), usando peneira com crivo de 5 mm para posterior preparação dos extratos e determinação dos compostos secundários.

3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

O extrato etanólico de *Sida galheirensis* Ulbr foi obtido por meio do processo de maceração exaustiva, com uso de etanol como solvente, onde cada extração ocorreu durante 72 horas, seguida de duas remacerações, no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos pertencente a Universidade Federal da Paraíba (IPeFarM / UFPB – João Pessoa/PB – Brasil). Após a obtenção do líquido extrativo, este foi concentrado em rotaevaporador modelo R-210, na rotação 3 e a uma temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 1 - Rotaevaporador modelo R-210



Fonte: Arquivo pessoal

Logo após, foi realizada a análise de screening fitoquímico, de acordo com metodologia proposta por Matos et al. (1997) e Souza e Silva (2006). Observando a presença e/ou ausência de alcaloides, pelos métodos de Bouchardat, Mayer, Dragendorff e Ácido sílico-tungstíco, Esteroides, Saponinas, e Taninos e Flavonoides pelos métodos de gelatina a 0,5% e cloreto férrico a 2%, e fita de magnésio e fluorescência, respectivamente. O princípio dos testes se baseia na observação visual da alteração de cor ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS SECUNDÁRIOS

A quantificação dos principais compostos secundários dos extratos da *S. galheirensis* Ulbr 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).

3.3.1 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).

3.3.2 Taninos totais

A concentração de taninos totais foi estimada usando o método Folin-Ciocalteu. A mistura, 1 ml de extrato de *S. galheirensis* Ulbr 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 (PANSEIRA et al., 2003).

3.3.3 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).

3.3.4 Dieta Experimental

Para realização do ensaio, foi utilizado como substrato uma ração com relação volumoso: concentrado de 60:40, à base de feno de Tifton, milho moído e farelo de soja. Todos os ingredientes foram moídos em moinho de facas tipo Willey (Modelo MA 580, Marconi Ltd., Piracicaba, Brasil), utilizando peneiras de crivo de 1 mm. A composição química dos alimentos e da dieta foi determinada 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 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 1 - Composição química dos ingredientes e da ração experimental

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
Dieta experimental								
<i>Dieta (60:40, V:C)</i>	910,7	75,3	160,7	25,5	580,4	304,8	812,5	158,1
Proporção dos ingredientes da ração (g/kg MS)								
Feno de Tifton	Milho moído			Farelo de Soja				
608,0	230,0			162,0				

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

3.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS E DEGRADABILIDADE *IN VITRO*

A cinética de produção de gás foi avaliada através da técnica proposta por Mauricio et al. (1999) e modificada por Menezes et al. (2015), utilizando saquinhos de poliéster contendo 1g da ração experimental introduzidos no frasco antes da incubação. A pressão nos frascos foi medida por um indicador de pressão (DPI 705, Druck Ltd., General Electric's®; Leicester, UK) (Figura 1-A). As leituras de pressão (em *psi*) foram tomadas em uma frequência maior durante o período inicial de fermentação. A produção de gás foi registrada nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34 e 48 horas. Os dados foram transformados em volume pela equação: $V = (4,4392 \times p) + 0,8943$.

Figura 2 - Sistema semiautomático de produção de gás *in vitro*

Fonte: Arquivo pessoal

3.4.1 Animais doadores

Os animais utilizados como doadores de líquido ruminal foram dois ovinos Santa Inês (40 ± 3 kg de peso vivo), fistulados no rúmen, 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*.

3.4.2 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, além da solução redutora, conforme descrito por Theodorou et al. (1994). Não foi adicionado “resazurina” na solução redutora. Uma corrente de CO₂ foi borbulhada no meio de incubação por pelo menos três horas antes do uso.

Foram usados os seguintes reagentes para o preparo das soluções do meio de incubação; Solução Buffer: 4g de bicarbonato de amônia (NH₄HCO₃) e 35g bicarbonato de sódio (NaHCO₃), por litro de solução; Solução macromineral: 9,45g de fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄.12H₂O), 6,2g de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) e 0,6g de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O), por litro de solução. Solução micromineral: 13,2g de cloreto de cálcio (CaCl₂.2H₂O), 10,0g de cloreto de manganês (MnCl₂.4H₂O), 1,0 g de cloreto de cobalto (CoCl₂.6H₂O) e 8,0g de cloreto de ferro (FeCl₂.6H₂O), por 100 mL de solução; Solução redutora: 0,625g de Cisteína HCL.1H₂O, 0,625g de sulfeto de sódio (Na₂S.7H₂O), 4 mL de hidróxido de sódio (1M NaOH) e 95mL de água destilada.

3.4.3 Preparação do inóculo microbiano

O líquido ruminal, coletado 2 horas após a alimentação, foi filtrado através de quatro camadas de gaze, armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39 °C e imediatamente levado ao laboratório. O líquido coletado dos animais doadores foi misturado em proporções iguais, sendo continuamente purgados com CO₂, para manter as condições de anaerobiose.

3.4.4 Níveis testados e diluição dos extratos

Formação dos tratamentos: Controle (0% de extrato); 6% de extrato / g de substrato (0,064g de *S. galheirensis*); 12% de extrato / g de substrato (0,128g de *S. galheirensis*); 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).

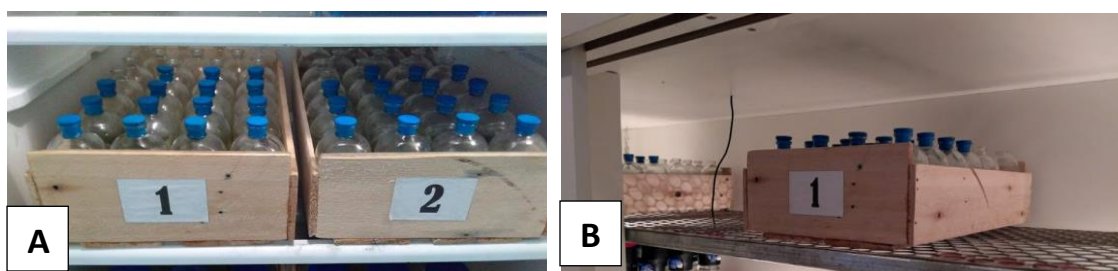
3.4.5 Preparo dos frascos de incubação

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 *Sida galheirensis* Ulbr diluído (diferentes níveis), totalizando 90 ml. Posteriormente o meio de incubação foi borbuhlado com CO₂ por 20 segundos, sendo os frascos em seguida, selados com tampa de borracha e colocados em caixas de madeira e refrigerados a 4 °C durante a noite.

Cinco horas antes do início do ensaio, os frascos de incubação foram transferidos para a estufa de produção de gás (Fig. 3B), mantida à temperatura de 39 °C, para garantir que a solução tampão estivesse na mesma temperatura (39 °C) no momento da inoculação do líquido ruminal.

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 (40mm x 1,20mm) (Lagrange et al., 2019). Logo em seguida, a pressão interna dos frascos foi eliminada, e estes transferidos para a estufa, registrando-se assim o início da incubação.

Figura 3 - (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



Fonte: Arquivo pessoal

3.4.6 Estimativa dos parâmetros cinéticos de produção de gás

Os parâmetros cinéticos da produção de gás foram estimados através do modelo logístico bicompartimental (Schofield et al., 1994):

$$V_t = \frac{V_{f1}}{1 + e^{2-4m1(T-L)}} + \frac{V_{f2}}{1 + e^{2-4m2(T-L)}}$$

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), $m1$ – taxa de produção de gás para a fração de rápida degradação, $m2$ – taxa de produção de gás para a fração de degradação lenta, L – lag time e T – tempo de fermentação.

3.4.7 Degradabilidade dos nutrientes

A degradabilidade da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta das dietas foi determinada pela remoção dos sacos de náilon (Menezes et al., 2015) após 48 horas de incubação. A remoção foi realizada 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.

Devido a quantidade do resíduo contido no saquinho após a incubação ser insuficiente, para a determinação da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta foi realizada uma amostra composta utilizando as quatro repetições de cada tratamento.

3.5 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS RUMINAIS

Para avaliação dos parâmetros ruminiais foram feitas coletas do líquido ruminal dos frascos de fermentação. O líquido ruminal foi homogeneizado e o pH foi mensurado através de leitura direta por meio de um potenciômetro digital portátil (K39-0014PA – KASVI). Posteriormente, cerca de 40 mL de líquido, sem ácido, foi armazenado em potes coletores, para mensuração do nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$). 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, passando posteriormente pelo processo de destilação e titulação.

3.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados (DBC). Foram utilizadas quatro repetições por tratamento / por ensaio, sendo realizado um total de três ensaios. Foram utilizados três níveis de extrato da *S. galheirensis* (0, 6 e 12% de extrato em relação à MS do substrato), conforme modelo geral:

$$Y_{ijl} = \mu + E_i + B_j + e_{ijl}$$

Onde, Y_{ijl} = valor observado; μ = média geral do experimento; E_i = efeito fixo da dose de extrato ($i = 0, 6$ e 12%); B_j = efeito fixo do bloco ($j =$ ensaio 1, 2 e 3); e_{ijl} = 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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2, estão apresentados os resultados da análise do screening fitoquímico, mostrando presença e/ou ausência dos compostos secundários e a quantificação através da espectrometria desses compostos presentes no extrato da *Sida galheirensis*.

Tabela 2 – Screening fitoquímico do extrato etanólico e quantificação dos compostos secundários da *Sida galheirensis* Ulbr

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					18,56 mg [*] EAG/g de extrato seco				
Taninos totais					31,10 mg ^{**} EAT/g extrato seco				
Flavonoides totais					147 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 gálico, ^{**}Equivalente ácido tânico, ^{***}Equivalente rutina; Ausência (-); Presença fraca (+); Presença média (++); Presença forte (+++)

A partir da análise do screening fitoquímico, é possível observar que o extrato da *Sida galheirensis* Ulbr não apresentou alcaloides e uma fraca presença de esteroides (Est). Contudo, é possível observar uma forte presença de taninos e flavonoides, quando analisados pelos métodos do FeCl⁺³ e Fluorescência (Fluo), respectivamente. Isso foi confirmado quando se avaliou a concentração dessas substâncias por meio de espectrometria (Tabela 2).

Em estudo avaliando o perfil fitoquímico das folhas da *Sida galheirensis* Ulbr, Fonteles (2016) também identificou a presença de esteroides (Est), flavonoides e taninos. Muito semelhante ao que foi encontrado neste trabalho, exceto pela ausência de saponinas.

A presença dos diferentes metabólicos secundários de plantas pode variar muito, mesmo dentro da mesma espécie, indicando que estas concentrações podem depender de fatores como a parte do vegetal analisado, idade e estado fisiológico, estação do ano, clima e estresse hídrico, além dos reagentes utilizados e o pré-tratamento da amostra no momento da extração, ou ainda do próprio solvente utilizado na extração de polifenóis (DO et al., 2013).

Na tabela 3, estão apresentados os resultados da estimativa dos parâmetros de produção de gás em função dos diferentes níveis de inclusão de extrato de *Sida galheirensis*.

Tabela 3 - Estimativa dos parâmetros de produção de gás *in vitro* em função dos níveis de extrato de *Sida galheirensis* Ulbr

Parâmetros	Tratamentos			P - valor	EPM
	Controle	6%	12%		
mL/g MS					
Vt	147,92c	156,62b	167,61 ^a	<0,0001	2,09
Vf ₁	103,99b	108,91ab	117,21 ^a	0,0066	2,21
Vf ₂	43,93	47,70	50,40	0,4041	2,60
mL/g MS/h					
mt	0,1288	0,1434	0,1617	0,1979	0,01
m1	0,0289	0,0288	0,0292	0,9185	0,0005
m2	0,0999	0,1146	0,1326	0,1748	0,009
L (horas)	3,6692a	3,1056b	2,7837c	<0,0001	0,08

Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. Vt – Produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais; Vf₁ – produção de gás potencial a partir dos carboidratos não fibrosos; Vf₂ – produção de gás potencial a partir de carboidratos fibrosos; mt – taxa de produção de gás a partir dos carboidratos totais; m1- taxa de produção de gás a partir dos carboidratos não fibrosos; m2- taxa de produção de gás a partir dos carboidratos fibrosos; L – lag time;

A produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais (Vt) aumentou com a inclusão do extrato da *Sida galheirensis* enquanto que a produção de gás potencial a partir dos carboidratos não fibrosos (Vf₁), foi considerada igual entre a inclusão de extrato de 6% e a dieta controle, sendo maior apenas na dieta contendo inclusão de 12% de extrato de *Sida galheirensis*. Contudo, a produção de gás oriunda da fermentação dos carboidratos fibrosos (Vf₂) e as taxas de produção de gás não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

A produção de gás potencial a partir dos carboidratos totais (Vt) aumentou com a inclusão do extrato de *Sida galheirensis*, indicando que provavelmente os compostos secundários presentes no extrato foram degradados e utilizados como fonte de energia. Resultados semelhantes foram encontrados por Jiménez-Peralta et al. (2011) trabalhando com *L. leucocephala* e *S. babilônica* relataram aumento de 47 e 68,7%, respectivamente, para produção de gases quando incluíram 1,8 mL de extrato/g de MS, indicando que houve uma melhora nos padrões de fermentação atribuída ao menor teor de metabólitos secundários que, possivelmente, possibilitaram a degradação pelos microrganismos, indicando que as saponinas, alcaloides e compostos fenólicos podem ser degradados pela microbiota e utilizados como fontes de energia.

Entretanto de acordo com Bodas et al. (2012) a degradação dos carboidratos fibrosos pode ser afetada pela presença de compostos secundários na dieta, especialmente devido a ação de saponinas, que possuem a capacidade de causar a desestabilização da

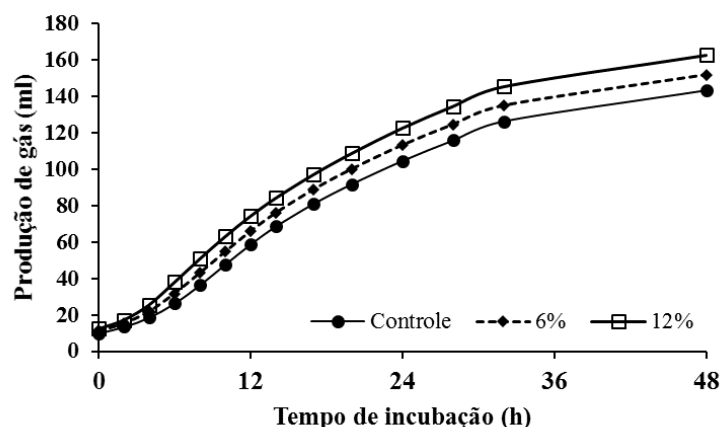
membrana plasmática das células bacterianas, principalmente as gram positivas em sua maioria cululolíticas, por conta de sua membrana celular simples quando comparadas ao arranjo mais complexo das bactérias gram negativas. Assim a célula perde o controle de sua osmolaridade e acontece um fenômeno conhecido como fuga dos íons, provocando a lise celular e levando ao atraso na replicação ou até mesmo a morte celular.

Porém, devido ao elevado teor de proteína da *Sida galheirensis* superior a 18% na MS, a presença do extrato nas dietas provavelmente também elevou o teor de proteína das mesmas, aumentando assim, consequentemente, o substrato proteico disponível para a degradação o que poderia favorecer o crescimento de microrganismos específicos, degradadores de carboidratos, especialmente os não fibrosos.

Por outro lado, os tratamentos com inclusão do extrato apresentaram menor *Lag time* (L) ($P < 0,0001$). Este parâmetro indica o tempo de colonização, ou seja, a velocidade com que a microbiota se adere às partículas do substrato e inicia o processo de degradação. Portanto, a redução na *Lag time* indica que a colonização foi mais rápida, indicando que provavelmente houve um aumento na presença de compostos altamente degradáveis, onde o extrato pode ter facilitado o acesso da microbiota à parede celular, e consequentemente, os compostos foram disponibilizados mais rapidamente.

Na figura 4 estão demonstrados os valores da produção cumulativa de gases para os níveis de extrato da *Sida galheirensis*, em função do tempo, utilizando o modelo matemático de Schofield et al. (1994), através da estimativa dos parâmetros de produção de gás e suas respectivas taxas. No gráfico é possível observar uma curva acentuada até cerca de 36 horas de incubação se tornando mais suave em seguida. Onde a produção cumulativa de gás foi maior para as dietas com inclusão de extrato quando comparada a dieta sem inclusão de extrato.

Figura 4 - Produção cumulativa de gás (mL) em função dos níveis de extrato de *Sida galheirensis* Ulbr.



Na tabela 4, estão demonstrados os resultados dos parâmetros ruminais e da degradabilidade dos nutrientes em função dos níveis de inclusão de extrato de *Sida galheirensis*. Verificou-se que o pH do meio de incubação diminuiu com o aumento dos níveis de extrato de *S. galheirensis* ($P < 0,0001$). Apesar da redução observada, o pH se manteve próximo à faixa ideal para o bom funcionamento do rúmen, que de acordo com Van Soest (1994), para atividade normal das bactérias celulolíticas está situada entre 6,2 e 7,2, sendo ideal para o crescimento desses microrganismos o pH igual a 6,7.

Na Tabela 4 é possível observar que a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (NAR) não diferiu entre os tratamentos ($P = 0,4995$), apresentando valor médio de 42,73 mg/dL. De acordo com Satter e Slyter (1974), o NAR reflete a taxa de aproveitamento da proteína fornecida na dieta e sua relação de produção e utilização pelos microrganismos, onde o ponto ótimo para o mínimo desempenho dos microrganismos é de 5 mg/dL. Mesmo com a inclusão do extrato de *Sida galheirensis* na dieta, que possui elevado teor de proteína o NAR se manteve igual nos três tratamentos, porém pode-se observar que a degradabilidade da proteína bruta (DPB) reduziu com a inclusão do extrato indicando que esta inibição pode ter feito com que a taxa de produção e utilização de N no rúmen tenha se mantido igual entre os tratamentos. Este efeito pode estar relacionado a atividade anti-protozoária apresentada por saponinas e óleos essenciais que estão associados à diminuição na disponibilização de amônia no rúmen (BODAS et al., 2012).

Entretanto, Oh et al. (2017) verificaram redução de 16,5% na quantidade de nitrogênio disponível no rúmen com inclusão de extrato de ginkgo indicando inibição seletiva do crescimento bacteriano, este efeito foi atribuído pelos autores a sensibilidade de bactérias produtoras de hiper-amônia, como a *P. anaerobius*, *C. sticklandii* e *C.*

Aminophilum, aos compostos secundários presentes no extrato de ginkgo, indicando maior fluxo de proteína dietética para o intestino.

Tabela 4 - Parâmetros ruminais e degradabilidade dos nutrientes às 48 horas de incubação em função dos níveis de extrato de *Sida galheirensis* Ulbr

Variável	Tratamentos			P – valor	EPM
	Controle	6%	12%		
pH	6,22a	6,06b	5,99b	<0,0001	1,76
NAR** (mg/dL)	43,18	42,81	42,20	0,4995	3,32
DMS ¹ *	719,31a	692,92b	680,65b	<0,0001	2,44
DMO ² *	709,60a	682,39b	668,41b	<0,0001	2,51
DPB ³ *	873,48a	853,44b	844,04b	<0,0001	1,26

Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de média.

¹Degradabilidade da matéria seca; ²Degradabilidade da matéria orgânica; ³Degradabilidade da proteína bruta; *g/kg MS; **Nitrogênio Amoniacal Ruminant.

As degradabilidades da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO) e da proteína bruta (DPB) foram significativamente superiores na dieta controle em comparação aos níveis de extrato de 6 e 12%, que foram consideradas iguais entre si. Segundo Medjkal et al. (2017) algumas plantas podem trazer efeito adverso sobre a degradabilidade do substrato e estão relacionadas diretamente com a redução de metano no rúmen, exibindo redução da metanogênese em resposta a redução da degradabilidade. Mesmo a *S. galheirensis* tendo um teor alto de proteína de 18,3% na MS, de acordo com Fonteles (2016) a redução da DPB pode ser explicada pela possível complexação das proteínas com o tanino presente no extrato, que acontece especialmente com um pH ruminal entre 6,0 e 6,30 (VAN SOEST, 1994).

Avaliando a adição de tanino de castanhas, Sarnataro e Spanghero (2020) observaram uma diminuição na produção de amônia ruminal atribuído ao aumento da população de bactérias não-celulolíticas, como a *P.ruminicola* e *S. ruminantium*, sendo estas bactérias conhecidas por utilizarem amônia para síntese de aminoácidos.

5 CONCLUSÃO

O nível de inclusão de 6% de extrato da *Sida galheirensis* Ulbr foi suficiente para modular a fermentação ruminal, aumentando a produção total de gás e diminuindo a degradabilidade dos nutrientes.

REFERÊNCIAS

- AOAC (2005). **Official method of Analysis**. 18th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
- BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. et al. **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006.
- 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, n.1-4, p.78-93, 2012.
- CALABRÒ, S. Plant secondary metabolites. In: **Rumen Microbiology: From evolution to revolution**. Springer, New Delhi, p.153-159, 2015.
- CANNAS, A. **Tannins: fascinating but sometimes dangerous molecules**. Itaka, 2005. Acesso em 03 de março de 2020. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.htm>.
- CORDÃO, M.A.; FILHO, J.M.P.; BAKKE, O.A. et al. Taninos e seus efeitos na alimentação animal: Revisão bibliográfica. **PUBVET**, Londrina, v.4, n.32, 2010.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C. et al. **Métodos para análises de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012. 214p.
- DIORENZO, N.; DIEZ-GONZALES, F.; DICOSTANZO, A.; Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2178-2185, 2006.
- DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of food and drug analysis**, v.22, n.3, p.296-302, 2014.
- FERNANDES, B.D.O. (2018). **Sistema de alimentação de cabras em lactação como fator indutor da qualidade do leite**. Tese. Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, 129p.
- 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.
- FRUTOS, P.; HERVAS, G.; GIRÁLDEZ, F.J. et al. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.2, n.2, p.191-202, 2004.

JAFARI, S.; EBRAHIMI, M.; GOH, Y.M. et al. Manipulation of rumen fermentation and methane gas production by plant secondary metabolites (saponin, tannin and essential oil): a review of ten-year studies. **Annals of Animal Science**, v.19, n.1, p.3-29, 2019.

JIMÉNEZ-PERALTA, F.S.; SALEM, A.Z.M.; MEJIA-HERNÁNDEZ, P. 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, n.2-3, p.192-200, 2011.

KOZLOSKI, G. V.; **Bioquímica dos ruminantes**; 2ª ed.; Santa Maria – RS; Ed. Da UFSM, 2009.

LANGRANGE, 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.

LONGO, C. (2007). **Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico**. Tese. Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 153p.

MACÊDO, M. J. F. RIBEIRO, D. A.; SANTOS, M. O. et al. Fabaceae medicinal flora with therapeutic potential in Savanna areas in the Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.28, n.6, p.738-750, 2018.

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.

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*. **Química Nova**, v.35, p.517-522, 2012.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2th ed., Edições: UFC Fortaleza, 1997.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. et al. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.

MEDJEKAL, S. BODAS, R. BOUSSEBOUA, H. et al. Evolution of three medicinal plants for methane production potential, fiber digestion and rumen fermentation *in vitro*. **Energy Procedia**, v.119, p.632-641, 2017.

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.

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.

MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. **Aditivos**. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.; Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: Funep, p.539-561, 2006.

OH, S.; SHINTANI, R.; KOIKE, S. et al. Ginkgo fruit extract as an additive to modify rumen microbiota and fermentation and to mitigate methane production. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.3, p.1923-1934, 2017.

OLIVEIRA, J.S. (2005). **Utilização da monensina e da própolis para manipulação e fermentação ruminal em bovinos**. Tese. Universidade Federal de Viçosa-MG, 52p.

OLIVEIRA, V.S.; Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina**, Ano XI, n. 20, 2013.

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. Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.6, p.416-428, 2011.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutrition Research Reviews**, v.22, n.2, p.204-219, 2009.

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T. et al. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.3, 2005.

RANGEL, A.H.N.; LEONEL, F.P.; SIMPLÍCIO, A.A. et al. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e ciências da terra**, v.8, n.2, 2008.

RIVERA, A.R.; BERCHIELLI, T.T.; MESSANA, J.D. et al. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-tifton 85 e concentrado com aditivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.617-624, 2010.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J.; Minireview - Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.

SALMAN, A.K.D.; PAZIANI, S.F.; SOARES, J.P.G. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2006.

SARAIVA, A. M.; LIMA, I. I.; OLIVEIRA, V. H. D. et al. Estudo etnobotânico e da atividade antimicrobiana de plantas utilizadas na medicina popular em Cajazeiras-PB. **Journal of Biology e Pharmacy and Agricultural Management**, v.14, n.2, 2018.

SARAIVA, M.E.; ULISSES, A.V.R.A.; RIBEIRO, D.A. et al. Plant species as a therapeutic resource in areas of the savanna in the state of Pernambuco, Northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.171, p.141-153, 2015.

SARNATARO, C.; SPANGHERO, M. Fermentação no rúmen *in vitro* de substratos alimentares adicionados com taninos de castanha ou extrato de *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Nutrição Animal**, v.6, p. 54-60, 2020.

SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British journal of nutrition**, v.32, n.2, p.199-208, 1974.

SCHOFIELD, P., PITT, R.E., PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.

SILVA, C.M.A. (2013). **Metabólitos secundários de plantas do semiárido de Pernambuco - uma inovação no controle de fitopatógenos**. Dissertação. Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 112p.

SILVA, D.A.; SILVA, T.M.S.; LINS, A.C.S. et al. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirensis* Ulbr. (Malvaceae). **Química Nova**, v.29, n.6, p.1250-1256, 2006.

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.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. 2. 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. 1th ed.; Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

SPANGHERO, M.; ZANFI, 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, n.1-4, p.364-374, 2008.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases; **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004.

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.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S.; **Fermentação ruminal**. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G.; Nutrição de ruminantes; Jaboticabal; Funep, p.151-171, 2006.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.^a Edición. Ithaca, United States: editora: Cornell University, 1994.

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