

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ÓLEO BRUTO DE *Pterodon Emarginatus Vogel* (SUCUPIRA) COMO
MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM SISTEMA DE
CULTURA CONTÍNUA DE DUPLO FLUXO**

José Tiago das Neves Neto
Orientador: Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes

GOIÂNIA
2015



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** Dissertação Tese

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

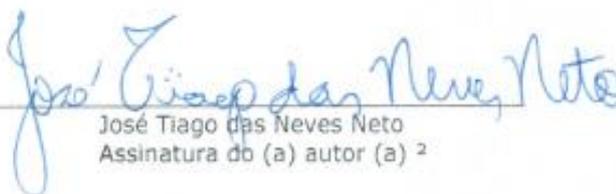
Nome completo do autor: José Tiago das Neves Neto

Título do trabalho: **ÓLEO BRUTO DE *Pterodon Emarginatus Vogel* (SUCUPIRA) COMO MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM SISTEMA DE CULTURA CONTÍNUA DE DUPLO FLUXO.**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


 José Tiago das Neves Neto
 Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 25/01/2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

JOSÉ TIAGO DAS NEVES NETO

**ÓLEO BRUTO DE *Pterodon Emarginatus Vogel* (SUCUPIRA) COMO
MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM SISTEMA DE
CULTURA CONTÍNUA DE DUPLO FLUXO**

Tese apresentada para obtenção do grau de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Produção Animal

Linha de pesquisa:

Metabolismo nutricional,
alimentação e forragicultura na produção animal

Orientador:

Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes
– EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Milton Luiz Moreira Lima - UFG
Prof. Dr. Alexandre Vaz Pires - USP

GOIÂNIA

2015

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

Neves Neto, José Tiago das
ÓLEO BRUTO DE *Pterodon Emarginatus* Vogel (SUCUPIRA)
COMO MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM SISTEMA
DE CULTURA CONTÍNUA DE DUPLO FLUXO [manuscrito] / José
Tiago das Neves Neto. - 2015.
xi, 47 f.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes; co orientador Dr. Milton Luiz Moreira Lima; co-orientador Dr. Alexandre Vaz Pires.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2015.

1. Aditivo. 2. Sucupira. 3. Monensina. 4. Nutrição de ruminantes. 5. Sistema de cultura contínuo em duplo fluxo. I. Fernandes, Juliano José de Resende, orient. II. Título.

CDU 635

1 ATA NÚMERO 202 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR JOSE TIAGO DAS NEVES
4 NETO. Às 14h00min do dia 29/05/2015, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de
5 Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade
6 Federal de Goiás, Campus II Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão
7 Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado
8 apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) JOSE TIAGO DAS NEVES NETO, intitulada
9 "Sistema de cultura contínua de duplo fluxo na avaliação do extrato bruto de *Pterodon*
10 *emarginatus vogel* (Sucupira) como modulador da fermentação ruminal", apresentada
11 para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal, junto à Área de Concentração:
12 **Produção Animal** desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora Prof. Dr.
13 Romão da Cunha Nunes, iniciando os trabalhos, concedeu, a palavra ao (a) candidato (a)
14 JOSE TIAGO DAS NEVES NETO para exposição em cinquenta minutos do seu trabalho. A
15 seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos
16 Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de
17 vinte minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores
18 Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
19 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a)
20 **Aprovado (a) ou Reprovado (a):**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes
Prof. Dra. Vera Lúcia Banyas – UFG/Jataí
Prof. Dr. Gumercindo Loriano Franco - UFMS
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira
Prof. Dr. José Henrique Stringhini

**APROVADO (A)
/REPROVADO (A)**

ROMÃO NUNES APH 17/15
VERA LUCIA APROVADO
GUMERCINDO APROVADO
REGINALDO APROVADO
JOSE HENRIQUE APROVADO

18 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) JOSE
19 TIAGO DAS NEVES NETO, HABILITADO. (Habilitado (a) ou não
20 **Habilitado (a)**). Nada mais havendo a tratar, eu Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes, lavrei a
21 presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Romão da Cunha Nunes
Prof. Dra. Vera Lúcia Banyas – UFG/Jataí
Prof. Dr. Gumercindo Loriano Franco - UFMS
Prof. Dr. Reginaldo Nassar Ferreira
Prof. Dr. José Henrique Stringhini

ASSINATURA

ROMÃO NUNES
VERA LUCIA
GUMERCINDO
REGINALDO
JOSE HENRIQUE

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

EXTRATO BRUTO DE PTERODON EMARGINATUS VOGEL (SUCUPIRÁ)
COMO MODULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM SISTEMA
DE CULTURA CONTÍNUA DE DUPLO FLUXO

Aos meus pais,

Cláudio Antônio Leandro de Oliveira

Eva Aparecida Neves de Oliveira

Às minhas irmãs,

Ana Cláudia Neves de Oliveira

Maryana Rhafaela Neves Abadia

À minha sobrinha

Leonora Oliveira Favaretti

À minha noiva,

Míria Batista Resende

DEDICO

Aos meus avós paternos,

Armando José de Oliveira (*in memoriam*)

Iraci Leandro (*in memoriam*)

Aos meus avós maternos,

José Tiago das Neves (*in memoriam*)

Albertina do Coração de Jesus Neves

Aos meus tios

Crisalto Leandro de Oliveira (*in memoriam*)

Olga Maria Neves do Prado (*in memoriam*)

Marlene Maria José Neves de Melo (*in memoriam*)

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Deus pelo espetáculo da vida, seu amor, suas dádivas e pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Goiás. À Escola de Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Produção em Animal, em especial ao Professor Marcos Café que sem medir esforços sempre lutou para o crescimento de nossa Escola.

Ao Programa de Pós-graduação Ciência Animal, em especial ao Professor Eugênio Gonçalves de Araújo, Professora Cíntia Silva Minafra e Rezende e a Professora Naida Cristina Borges que com dedicação e empenho desempenharam brilhante trabalho frente à coordenação deste Programa.

Ao Professor Juliano José de Resende Fernandes pela valiosa oportunidade, confiança e pela orientação na execução deste trabalho.

Ao Professor José Eduardo Portela Santos pela oportunidade e orientação durante meu estágio na Universidade da Flórida, pela confiança e ensinamentos.

Ao Professor Romão da Cunha Nunes que sem hesitar aceitou o desafio para a finalização deste trabalho.

Ao Professor Milton Luiz Moreira Lima por me orientar para o exame de Qualificação e pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Ao Professor Emmanuel Arnhold, pelas valiosas ideias e pronta ajuda durante as análises estatísticas.

À Dra. Maria Rodríguez Prado, pesquisadora da Universidade Autônoma de Barcelona, que teve participação mais que especial na execução deste trabalho, cuja orientações e ensinamentos foram essenciais. Uma grande profissional, uma pessoa fantástica e uma amiga valiosa.

À todos os Professores do PPG em Ciência Animal e do Departamento de Produção Animal, em especial ao Professor Reginaldo Nassar, Professor Romão da Cunha Nunes, Professor Adilson Donizeti Damasceno, Professor Aldi Fernandes de Souza França, Professora Alessandra Gimenez Mascarenhas, Professora Cely Marini Melo e Oña, Professora Heloísa Helena de Carvalho Mello, Professor José Henrique Stringhini, Professora Nadja Susana Mogyca Leandro, Professor Paulo Hellmeister Filho e Professor Paulo Henrique Jorge da Cunha, pelos momentos de convivência, conhecimentos e pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos Professores que, desde a escola primaria até a conclusão deste curso, me guiaram como um farol, que aponta um caminho revelando os perigos e os caminhos mais brandos, passaram por minha vida deixando sempre um pouquinho de si, sempre a me incentivar. Aos Mestres que foram além do ensino de fórmulas, de teoremas e vias metabólicas, mas se preocuparam em transmitir com o exemplo de suas vidas os bons princípios, a ética e a moral. Preocupados com a evolução do “Ser” e o bem-estar de toda uma sociedade e uma nação.

Aos funcionários da EVZ que sempre dispostos e receptivos, não deixam as engrenagens pararem. Em especial, Andréia Oliveira de Santana, Benedito Pereira da Silva, Bruno César Ferreira Gonzaga, Eder de Sousa Fernandes, Gerson Luís Barros, Hélio Alves de Carvalho, Paula de Oliveira Cortines, Reginaldo Jacovetti e Neide da Silva.

Aos amigos pós-graduandos que fizeram com que a caminhada se tornasse mais fácil e a vida mais alegre, em especial Marcondes, Marcela, Thiago (Ceará), Sérgio, Leonardo (Lacraia), Flávia Martins, Barbara Juliana, Tiago Pereira, Kíria Karolline e Fabíola.

Aos estagiários e amigos Lidiamar Lorena e Ricardo Augusto, cuja ajuda foi essencial para a realização deste trabalho. À todos os estagiários que contribuíram para o desenvolvimento deste e de outros projetos, pelo apoio, dedicação e pela amizade.

À CONPAVET Jr. pela confiança, oportunidade e pelos momentos de convivência, em especial aos alunos Alexandre, Brenner, Tiago Tobias, Gabriel, Alexandre Akio, Carolina, Artur, Bruna, Thawanne, Luane e Débora.

Aos amigos e irmãos da República “Casinha” pelos momentos de muita alegria e muito aprendizado, Marcondes, Marcelo, Thiago (Ceará), Thiago Vilar, Alex, Carlos e Bruno Moraes.

Aos amigos Leandro Batista Urzêda Caetano e Professora Fabyola Barros Carvalho pelas longas conversas, ensinamentos e amizade.

As agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPEG, que concederam minha bolsa de estudos, minha bolsa de Doutorado Sanduiche e provimentos para a realização do meu experimento.

Aos trabalhadores e contribuintes brasileiros, que com esforços e dedicação a nossa pátria, financiaram meus estudos.

Aos meus pais pelo amor, pelos bons exemplos, pela dedicação, pela doação de vida, pelo incentivo, pelos puxões de orelha, pelo afeto, pelo carinho, pela confiança, pela amizade e pelo companheirismo. Minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos Ana Cláudia, Maryana, Pérola e Maicon pelas alegrias, pelas brigas, pelo amor, abraços e momentos de felicidade. À Minha sobrinha Leonora por trazer amor, alegria, esperança e união para as nossas vidas.

À minha amada noiva Míria, pelo amor, afeto, carinho, principalmente, pela amizade e companheirismo, sempre ao meu lado com seu jeito meigo me apoiando e incentivando.

À minha querida e amada avozinha Dona Albertina por ser esse ninho de amor, onde sempre encontramos um lindo sorriso e afetuoso abraço. Aos meus tios e tias, primos e primas, cujas presenças em minha vida é motivo de grande júbilo.

À minha nova família, meus sogros Sr. Gebaldo e Dona Fátima, meus cunhados Diogo, Sérgio e Wilker, concunhadas Sheila e Ana Paula e sobrinhas Nicole e Alice, que me receberam com afeto e carinho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho...

minha eterna gratidão...

MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

“A ciência infatigável procura, agora, a matéria-padrão, a força-origem, simplificada, da qual crê emanarem todos os compostos, e é nesse estudo proveitoso que ela própria, afirmando-se ateia, descrente, caminha para o conhecimento de Deus.”

Emmanuel

“A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las.”

Aristóteles

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Caracterização dos Extratos vegetais	4
2.2 Óleos essenciais.....	5
2.3 Óleo bruto de sucupira.....	9
2.4 Extratos vegetais e a fermentação microbiana ruminal	9
2.5 Utilização de óleos essenciais na nutrição de ruminantes	11
2.6 Fermentação Ruminal <i>In Vitro</i>	12
REFERENCIAS	14
CAPÍTULO 2 –DIGESTIBILIDADE IN VITRO EM SISTEMA DE CULTURA CONTÍNUO DE DUPLO FLUXO: O APARELHO.....	17
CAPÍTULO 3 – EXTRATO BRUTO DE PTERODON EMARGINATUS VOGEL (SUCUPIRA) COMO MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO MICROBIANA RUMINAL: DIGESTIBILIDADE <i>IN VITRO</i> EM SISTEMA DE CULTURA EM FLUXO CONTÍNUO	28
INTRODUÇÃO	28
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1 Local	29
2.2 Tratamentos e dietas experimentais.....	29
2.3 Período Experimental	30
2.4 Sistema de Cultura em Fluxo Contínuo.....	30
2.5 Colheita de amostras.....	32
2.6 Análises Laboratoriais	32
2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas	33
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
3.1. Extrato bruto de Sucupira	34
3.2 Digestibilidade.....	35
3.3 Ácidos graxos de cadeia curta	38
4 CONCLUSÃO.....	43
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
REFERÊNCIAS	45

ÓLEO BRUTO DE *Pterodon Emarginatus Vogel* (SUCUPIRA) COMO MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM SISTEMA DE CULTURA CONTÍNUA DE DUPLO FLUXO

RESUMO

A manipulação da fermentação ruminal é valiosa ferramenta na busca do aumento da produtividade e da eficiência na utilização dos recursos destinados à alimentação animal. Existem diversas ferramentas como a mistura uniforme da ração, o manejo adequado de cocho, a formulação correta da ração e a utilização de compostos que visam auxiliar o processo fermentativo do rúmen denominados aditivos. O uso de antibióticos como promotores de crescimento em alimentos para animais tem enfrentado resistência, devido aos resíduos e a resistência bacteriana que estes produtos podem gerar. Por isso, o uso de antibióticos em sistemas de produção de ruminantes foi proibido na União Europeia em janeiro de 2006. Desta forma, algumas tecnologias têm sido desenvolvidas para substituir estes produtos e dentre estes, os extratos vegetais vêm sendo amplamente estudados na nutrição de ruminantes como moduladores da fermentação microbiana ruminal. Estas plantas são ricas em compostos ativos com poder antimicrobiano tornando-as úteis na nutrição animal como aditivos. O óleo bruto de sucupira apresenta, em sua composição sesquiterpenos e diterpenos sendo, o β -cariofileno, o composto de maior concentração. Diante das limitações da aplicação de produtos desconhecidos na alimentação animal, as técnicas de digestibilidade *in vitro* e estudos metabólicos com animais canulados no rúmen são recomendados nas etapas iniciais da pesquisa. Com o presente trabalho objetivou-se avaliar diferentes doses do óleo bruto de Sucupira sobre a fermentação microbiana ruminal *in vitro* através de um sistema de cultura contínua de duplo fluxo. Os tratamentos foram constituídos de quatro doses: 0%; 0,06%; 0,12%; 0,24% na matéria seca (MS) da dieta fornecida do extrato bruto de Sucupira e um tratamento com Monensina Sódica (30 ppm). O delineamento experimental realizado foi em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições e cinco tratamentos. No ensaio *in vitro*, houve diferença ($P < 0,05$) na digestibilidade da MS e MO entre o tratamento 0,24% do extrato de sucupira e os tratamentos controle e monensina. Não se observou diferenças ($P > 0,05$) na digestibilidade da FDN e FDA. A adição do extrato de *Pterodon emarginatus Vogel* (Sucupira) aumentou a digestibilidade da MS e MO comparados com a Monensina Sódica, sem efeitos na DFN e DFA. A concentração do ácido acético foi afetada ($P < 0,05$) pelos tratamentos, observando uma diminuição da concentração para o tratamento 0,24% comparado com o tratamento controle. O mesmo ocorreu com a relação entre os ácidos acético e propiônico, onde o tratamento 0,24% ocasionou uma menor relação comparado com os tratamentos controle e 0,06%. O extrato de *Pterodon emarginatus Vogel* (Sucupira) tem potencial de modular a fermentação ruminal devido ao seu efeito nos microrganismos ruminais, sendo seu efeito dose dependente, podendo ser usado como aditivo para manipular a fermentação no rúmen e ser um provável substituto da monensina sódica, porém mais estudos devem ser realizados para elucidar e responder as dúvidas referentes a utilização destas substâncias, como esclarecer os efeitos desses produtos sobre os microrganismos ruminais, seus efeitos no metabolismo animal, nos parâmetros de fermentação ruminal *in vivo*, quantificar as doses a serem utilizadas e quantificar os ganhos em desempenho animal. O Sistema de Cultura em Fluxo Contínuo mostrou ser uma importante metodologia alternativa e de precisão para o estudo de digestibilidade ruminal.

Palavras-chave: Aditivo, Sucupira, Monensina, Nutrição de ruminantes, Sistema de cultura contínuo em duplo fluxo, digestibilidade *in vitro*.

***Pterodon Emarginatus Vogel* (SUCUPIRA) OIL AS A RUMINAL FERMENTATION MANIPULATOR IN A DUAL FLOW CONTINUOUS CULTURE SYSTEM**

ABSTRACT

The manipulation of ruminal fermentation is a valuable tool aiming at increasing productivity and efficiency by using resources for animal feed. There are different kinds of tools, such as homogeneous mixing of feed, appropriate trough management, correct feed formulation, and the use of compounds (additives) aimed at assisting rumen fermentation process. The use of antibiotics in foods for animals as growth promoters is facing a social barrier, because of the waste and bacterial resistance that these products can be generating. For that reason the use of antibiotics for this end or at the diet of ruminants has been banned from the EU since January 2006. Therefore, some technologies have been developed to replace these products, and the use of vegetable extracts in ruminants nutrition as ruminal fermentation modulators have been largely studied. Some plants are rich in active compounds with antimicrobial power that makes them useful for animal nutrition. The crude extract of *Pterodon Emarginatus Vogel* presents sesquiterpenes and diterpenes in its composition, and β -caryophyllene is the most representative compound. Due to the limitations of using unknown products in animal nutrition, the techniques of *in vitro* digestibility and metabolic studies with animals cannulated in the rumen are largely used at the first stages of research. The objective of this study was to evaluate different dosages of *Pterodon Emarginatus Vogel* crude extract *in vitro* ruminal fermentation through a system of continuous culture of double flow. The treatments corresponded to four doses: 0%; 0.6%, 0.12%; and 0.24% of *Pterodon Emarginatus Vogel* crude extract in dry matter (DM) of the provided diet and a treatment with Sodium Monensin (30 ppm). The experimental design was entirely in randomized blocks with four replications and five treatments. The *in vitro* test showed a difference of ($P < 0.05$) in the DM and OM digestibility between the treatments 0.24% of *Pterodon Emarginatus Vogel* crude extract and monensin. There was no difference ($P > 0.05$) in the digestibility of NDF and ADF. The addition of the *Pterodon Emarginatus Vogel* extract increased the digestibility of DM and OM when compared with Sodium Monensin without effects on NDF and ADF. The treatments affected ($P < 0.05$) acetic acid concentration, and the concentration 0.24% showed a decrease when compared with control treatment. The same happened with the relation between acetic and propionic acids, where 0.24% treatment produced a lower ratio compared with control and 0.06% treatments. The extract of *Pterodon emarginatus Vogel* has potential to modulate the ruminal fermentation because of its effect on ruminal microorganisms, and it is dose-dependent. Thus it can be used as an additive to manipulate ruminal fermentation and probably as a substitute of the sodic monensin. However, more studies must be carried out to answer the questions about the use of this substances, to clarify the effects of this products on the ruminal microorganisms, its effects on animal metabolism, parameters of *in vivo* ruminal fermentation, quantify the dosages to be used and quantify animal performance gain. The Culture System in Continuous Flow revealed to be an important alternative method and it showed accuracy for ruminal digestibility studies.

Keywords: Additives, Ruminant nutrition, Sucupira, Monensin, Culture System in Continuous Dual Flow, *in vitro* digestibility.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

INTRODUÇÃO

Observa-se um avanço significativo da pecuária brasileira, principalmente devido ao aumento do nível tecnológico das propriedades, sendo cada vez maior a aceitação e utilização de conhecimento técnico-científico pelos técnicos e produtores da área de produção animal. A nutrição animal destaca-se pelo seu grande avanço científico, sendo responsável por grande parte do aumento da produtividade da bovinocultura.

A manipulação da fermentação ruminal é uma valiosa ferramenta de técnicos e nutricionistas na busca do aumento da produtividade e eficiência na utilização dos recursos utilizados na alimentação animal. Os objetivos da manipulação da fermentação ruminal são a melhoria dos processos benéficos no rúmen, como a degradação da fibra, e a diminuição ou eliminação dos processos prejudiciais, como a produção de metano e o excesso de lactato, mantendo assim o pH estável e melhorando a saúde ruminal (NAGARAJA et al., 1997). Para que tais objetivos sejam alcançados, existem diversas ferramentas, como a mistura uniforme da ração, o manejo de cocho adequado e a formulação correta da ração e a utilização de compostos que visam manipular o processo fermentativo do rúmen (aditivos).

O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por meio da Instrução Normativa 15/2009, que considera aditivo para produtos destinados à alimentação animal, sendo: “Substância, micro-organismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano”. Entre os principais aditivos utilizados na alimentação de ruminantes estão os antibióticos ionóforos e não-ionóforos, leveduras, probióticos, prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas e extratos vegetais.

Um dos mais bem sucedido exemplo de como a manipulação de fermentação ruminal contribui para o aumento do desempenho animal foi o uso de ionóforos. A monensina sódica, por exemplo, é utilizada comercialmente na produção de ruminantes desde a década de 70 do século passado. Seu uso, dentre outros efeitos, melhora a eficiência alimentar, diminui a produção de metano e minimiza os riscos de ocorrência de distúrbios

metabólicos (RUSSEL & STROBEL, 1989). Todavia, a legislação classifica os ionóforos como antibióticos, o que faz seu uso ser cada vez mais criticado pela sociedade consumidora (ARAUJO, 201).

Cresce a preocupação dos consumidores, havendo receio de se consumir alimentos produzidos com antibióticos. Todavia, ainda não existem explicações razoáveis justificando que o uso de ionóforos provoca a seleção de bactérias patogênicas humanas com resistência a antibióticos (RUSSELL & HOULIHAN, 2003).

Frente aos desafios entre questões econômicas e de saúde pública, há crescente interesse científico por alternativas que mimetizem os efeitos dos ionóforos sobre a população microbiana do rúmen, sendo seguras ao consumo humano e, ao mesmo tempo, aceitas pela sociedade. Devem ser alternativas que permitam ganhos zootécnicos, redução nos custos de produção, além de segurança e satisfação do consumidor final juntamente com menor agressão ao meio ambiente.

Dentre as diversas opções, compostos secundários dos vegetais têm grande potencial de utilização como aditivo na manipulação da fermentação ruminal. Dentre as principais vantagens da utilização destes compostos está o baixo risco de aparecimento de resistência microbiana, já que compostos secundários apresentam na maioria das vezes diversos princípios ativos, o que confere diferentes modos de ação (ACAMOVIC & BROOKER, 2005).

Sistemas de alimentação modernos e eficientes precisam ser fundamentados em mecanismos que determinam a resposta dos animais aos nutrientes, lidando com aspectos quantitativos da digestão e do metabolismo do ruminante (MERTENS, 2005). É consenso que, para a descrição quantitativa apropriada dos processos digestivos e metabólicos, são necessários dados biológicos que podem ser obtidos usando técnicas *in vitro* (MOULD et al., 2005), precedentes ou em substituição aos ensaios *in vivo* e *in situ*.

O estudo direto da fermentação ruminal é difícil e diferentes sistemas tem sido propostos para permitir que o conteúdo ruminal continue a fermentação em condições controladas de laboratório seguindo padrões normais do organismo animal (LÓPEZ, 2005).

Perante o exposto a hipótese do trabalho é a utilização do extrato bruto de Sucupira como aditivo ruminal seria capaz de modular a fermentação ruminal com benefícios fermentativos, otimizando a digestibilidade da matéria seca e diminuindo as variações do pH ruminal, sendo um possível substituto a monensina sódica.

Os objetivos deste trabalho foram a implantação e avaliação de um sistema de cultura contínua de duplo fluxo para realização de testes de digestibilidade *in vitro* e a avaliação de diferentes doses do extrato bruto de Sucupira e seus efeitos como modulador da fermentação ruminal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Caracterização dos Extratos vegetais

Existe grande quantidade e diversidade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no crescimento e desenvolvimento e são produzidos pelas plantas, e por isso, recebem o nome de metabólitos secundários. Embora não influenciem o crescimento e desenvolvimento apresentam como funções a proteção contra microrganismos e o ataque de insetos ou de animais herbívoros, entre outras. Alguns compostos são tóxicos para os animais enquanto outros não, sendo estes usados inclusive na medicina humana (WALLACE, 2004; TAIZ & TAIGER 2006).

Algumas plantas contêm compostos secundários com ação antimicrobiana comprovada como a *Artemisia absinthium* L. (losna), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Punica granatum* L. (romã), *Xanthosema violaceum* Schott (taioba) e *Syzygium cuminii* L. (jambolão) (MICHELIN et al., 2005), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) (ALVES et al., 2000) e *Pterodon emarginatus* Vogel (sucupira branca) (BUSTAMANTE et al., 2010).

A atividade antimicrobiana dos extratos de plantas é atribuída aos vários compostos secundários, que incluem saponinas, terpenos (carvacrol) e fenilpropanóides (eugenol) (BUSQUET et al., 2006). A genética das plantas, os fatores ambientais e as práticas de manejo adotadas afetam a composição química dos extratos (BOTREL et al., 2010) enquanto o solvente usado na diluição e as condições de extração relacionadas ao tempo e a temperatura afetam a concentração e a atividade antimicrobiana dos compostos (BODAS et al., 2012).

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupa cerca de 22% do território nacional e abriga mais de 220 espécies de plantas com uso medicinal reconhecido (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014).

ALVES et al. (2000) avaliaram espécies de plantas do Cerrado e seus efeitos sobre as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Estes autores constataram que 60% dos extratos das diferentes espécies de plantas tiveram alguma atividade, particularmente sobre as bactérias Gram-positivas *S. aureus* ou *B. cereus*. No entanto, somente os extratos de *Dalbergia nigra* (jacarandá-da-bahia), *Miconia albicans* (canela-de-velho), *Plathymenia foliolosa* Benth. (vinhático), *Roupala montana* Aubl. (cajueiro-bravo-da-serra) e *Stryphnodendron*

adstringens (barbatimão) inibiram significativamente o crescimento da bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Apesar da maioria dos compostos secundários apresentarem atividade antimicrobiana, existem diferenças na concentração mínima necessária para inibir os microrganismos e também na sensibilidade entre as espécies microbianas à ação dessas substâncias. Em geral, os compostos de baixo peso molecular são mais ativos contra microrganismos ruminais, sendo que os mecanismos moleculares ou celulares envolvidos na atividade antimicrobiana parecem diferir entre os compostos (BODAS et al., 2012).

Dentre os grupos de produtos secundários das plantas os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo e os diferentes compostos dessa classe são geralmente insolúveis em água (TAIZ & ZIEGER, 2006).

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários contendo um grupo fenol, ou seja um grupo funcional hidroxila e um anel aromático. Estas substâncias se classificam como compostos fenólicos e formam um grupo quimicamente heterogêneo de aproximadamente 10.000 compostos (TAIZ & TAIGER 2006). Os ácidos gálico e elágico são alguns exemplos, quando esterificados com açúcares representam o grupo de taninos hidrolisáveis. Enquanto os flavonóides representam os compostos polifenólicos, grupo no qual os taninos condensados pertencem (BODAS et al., 2012).

Existem os compostos secundários que contem nitrogênio em suas estruturas. Nessa classe inclui-se os alcalóides e glicosídeos cianogênicos. Muitos compostos secundários nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos comuns (TAIZ & TAIGER, 2006). Os alcalóides normalmente apresentam efeitos farmacológicos e podem ser tóxicos e teratogênicos para outros organismos (BODAS et al., 2012).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são os metabólitos secundários responsáveis pelo odor e cor das plantas e especiarias. Apresentam propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes o que os tornam opções de aditivos naturais em rações para animais (CASTILLEJOS et al., 2006). Nas plantas desempenham papel de proteção contra bactérias, fungos ou ataque de insetos (WALLACE, 2004).

O termo "essencial" deriva de "essência", que significa cheiro ou gosto, e relaciona-se com a propriedade destas substâncias de fornecer específicos sabores e odores.

Os óleos essenciais são caracterizados pela grande diversidade de composição, natureza e atividades (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Os compostos ativos mais importantes pertencem a dois grupos químicos: os terpenóides (monoterpenóides e sesquiterpenóides) e os fenilpropanóides. Estes compostos ativos são originários a partir de diferentes precursores do metabolismo primário e sintetizados por meio de diferentes vias metabólicas (CALSAMIGLIA et al., 2007).

A composição química dos os óleos essenciais é variável. São misturas principalmente de terpenóides, de forma expressiva os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e presença ou não de diterpenos (C20). Algumas plantas ainda contêm proporções significativas de fenilpropanóides, compostos não muito comuns nos óleos essenciais (Figura 1) (BENCHAAR et al., 2007; CALSAMIGLIA et al., 2007). Podem apresentar ainda uma variedade de compostos de baixo peso molecular, entre eles citam-se os ácidos orgânicos, aldeídos, hidrocarbonetos alifáticos, alcoóis entre outros (DORMAN & DEANS, 2000).

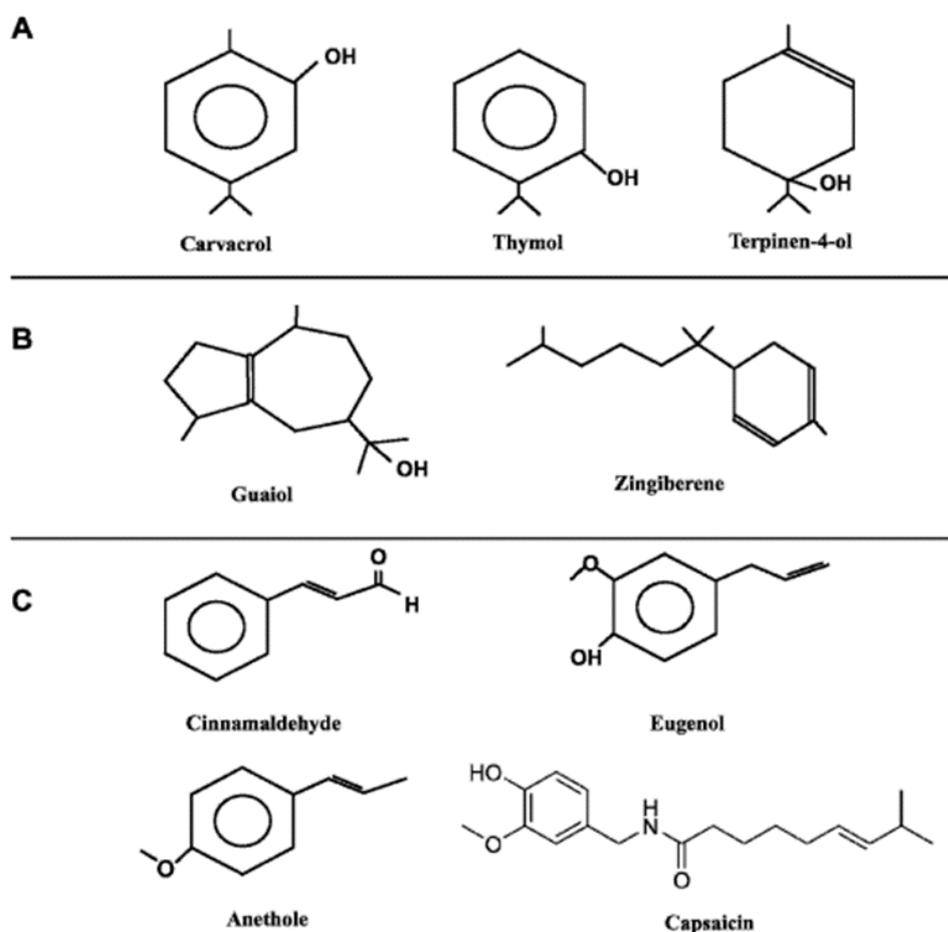


FIGURA 1 - Os principais componentes de óleos essenciais A: monoterpenos; B: sesquiterpenos; C: fenilpropanóides. Fonte: CALSAMIGLIA et al. (2007)

A atividade dos óleos essenciais é determinada pela composição química e grupos funcionais. Os componentes com estruturas fenólicas, tais como carvacrol, eugenol e timol, atuam contra os microorganismos (DORMAN & DEANS, 2000). Dessa forma, os compostos fenólicos são mais ativos e podem ocorrer interações sinérgicas ou antagonismo entre os componentes (BURT, 2004).

A ação dos óleos essenciais sobre a célula bacteriana é determinada por interações com a membrana celular, o extravasamento de íons e alterações no balanço de ATP (Figura 2).

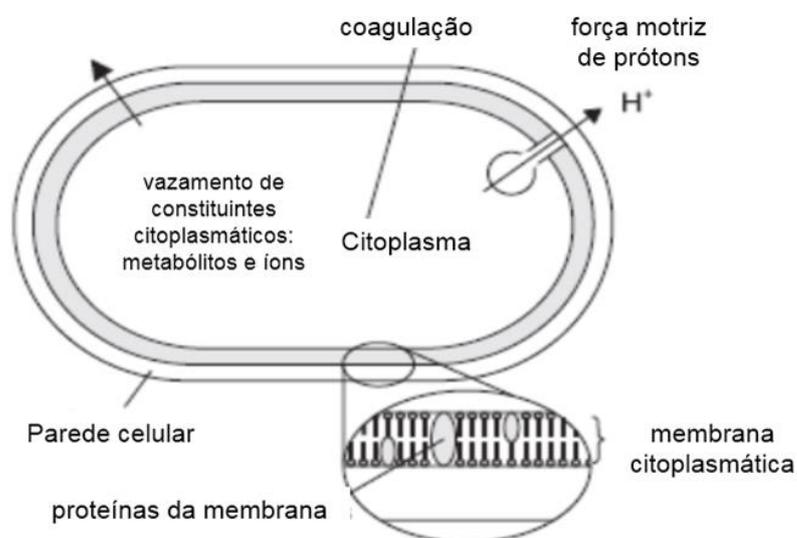


FIGURA 2 - Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais na célula bacteriana. Fonte: Burt (2004)

Segundo CALSAMIGLIA et al. (2007) os óleos essenciais interagem com a membrana bacteriana e a torna mais permeável, aumentando a translocação de íons e diminuindo o gradiente iônico. Assim, as bactérias gastam mais energia para tentar balancear os íons.

As bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis (BURT, 2004) do que as Gram-negativas pois estas possuem membrana externa de lipossacarídeos formando a parede celular e não permite a passagem de substâncias hidrofóbicas e, dessa forma, os óleos essenciais não atravessam na membrana celular (CHAO et al., 2000 e CALSAMIGLIA et al., 2007).

Contudo, DORMAN & DEANS (2000) relatam que membrana celular externa das bactérias Gram-negativas não é completamente impermeável a substâncias hidrofóbicas e moléculas de baixa massa molecular, pois estes compostos são capazes de interagir com

água por meio de pontes de hidrogênio e atravessar lentamente a parede celular por difusão, por meio de proteínas de membrana ou através de interação com a bicamada lipídica.

ULTEE et al. (1999) avaliando a ação dos terpenos de carvacrol no ambiente ruminal constataram que estes compostos interagem com os componentes lipídicos e as proteínas da membrana. O carvacrol ocupa mais espaço do que o normal entre as cadeias de ácidos graxos da membrana o que resulta em alterações na conformação da bicamada fosfolipídica. A atividade antimicrobiana do carvacrol é provavelmente causada por uma redução no pH como resultado da presença de um grupo hidroxila e um sistema de deslocamento de elétrons. O que poderia levar a redução na síntese de ATP e assim ao comprometimento dos processos essenciais na célula e finalmente a morte celular.

O carvacrol não dissociado se difunde através da membrana citoplasmática em direção ao citoplasma e dissocia-se liberando um próton. Em seguida, o carvacrol se liga a um íon potássio (K^+) ou outro qualquer e retorna ao meio extracelular, no qual ocorre nova dissociação e liberação do K^+ e o carvacrol recupera um íon H^+ (Figura 3) (ULTEE et al., 1999).

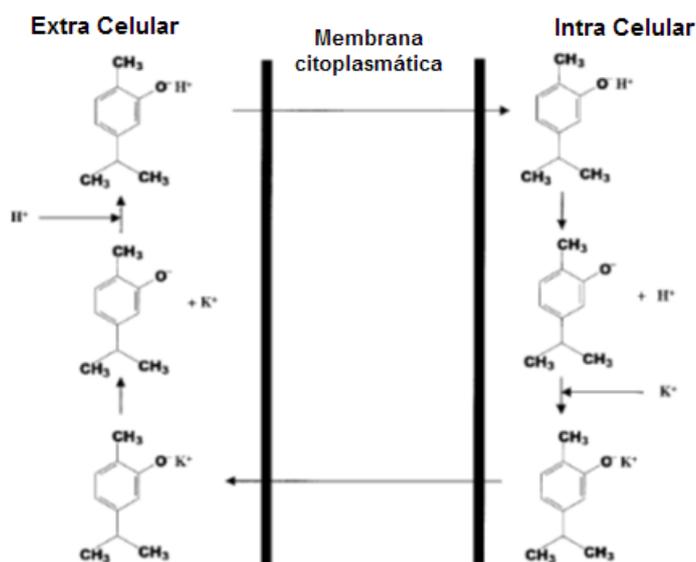


Figura 3 – Visão esquemática do provável mecanismo de ação do carvacrol. Fonte: ULTEE et al. (1999).

Embora a atuação na membrana celular parece ser a principal ação antimicrobiana dos óleos essenciais, este não é o único mecanismo de atuação (CALSAMIGLIA et al., 2007). FELDBERG et al. (1998) avaliando compostos presentes no óleo de alho constataram inibição da síntese de DNA, RNA e de proteínas.

2.3 Óleo bruto de sucupira

A sucupira (*Pterodon emarginatus* Vog.) pertence à família Leguminosae (Papilionoideae) é bem adaptada a solos de baixa fertilidade, apresentando porte de 10 a 15 m. Seu fruto possui endocarpo alado rico em óleo (SILVA et al., 2005).

BUSTAMANTE et al. (2010) identificaram flavonóides, heterosídeos saponínicos, resinas e traços de esteróides e triterpenóides nas cascas da *P. emarginatus*, que apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e o fungo *C. albicans*.

O óleo extraído das folhas é composto na grande maioria por hidrocarbonetos sesquiterpênicos e se assemelha a composição dos óleos presentes nos frutos descrita na literatura (SANTOS et al., 2010).

O óleo de sucupira apresenta composição química distinta e ocorrência de polimorfismo químico com a presença de 34 compostos diferentes (ALVES et al., 2013). Foram identificadas as presenças de trans-cariofileno (35,9%), β -elemeno (15,3%), germacreno D-(9,8%), α -humuleno (6,8%), espatulenol (5,9%), biciclo germacreno (5,5%) (DUTRA et al., 2012) e diterpenos como 6 α -7 β diacetoxivouacapan-17 β -oato de metila (HANSEN et al., 2010).

SILVA et al. (2005) avaliaram óleos essenciais extraídos dos frutos da sucupira como agente antimicrobiano em microrganismos fitopatogênicos e constataram que o extrato de sucupira apresenta potencial fungicida e bactericida. Além disso, observaram inibição no desenvolvimento micelial de *Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Ceratocystis fimbriata*, bem como de colônias bacterianas de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, *Xanthomonas campestris pv. campestris* e *Pseudomonas syringae*.

2.4 Extratos vegetais e a fermentação microbiana ruminal

BUSQUET et al. (2006) constataram que em geral a atividade microbiana ruminal é afetada pelo uso de extratos vegetais. O fornecimento de altas doses reduziu a produção total de AGCC, ácidos graxos de cadeia ramificada e as concentrações de N-NH₃.

CASTILLEJOS et al. (2006) avaliaram as doses 5, 50, 500 e 5000 mg/L de óleo essencial contendo os compostos eugenol, guaiacol, limoneno, timol e vanilina, avaliados em meio de cultura *in vitro* por 24 h e utilizando como substrato ração com proporção

volumoso:concentrado 60:40. Os efeitos observados foram dependentes das doses utilizadas. A dose 5000 mg/L reduziu a concentração total de AGCC, conseqüentemente maior pH ruminal em comparação ao tratamento controle (sem aditivo). A dose de 500 mg/L de Timol reduziu a concentração de AGCC (-28,5%), a proporção de propionato (-18,4%), a concentração de N-NH₃ (-31,9%) e de ácidos graxos de cadeia ramificada (-41,7%). Houve aumento na proporção molar de acetato (+1,8%), a relação acetato:propionato (+35,5%) e pH ruminal (+6,3%). A redução na concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada e N-NH₃ é consistente com a inibição do processo de deaminação.

CARDOZO et al. (2004) ao avaliarem a inclusão de 7,5 mg/kg na MS dos óleos de canela, alho, orégano e anis em fermentadores de fluxo contínuo observaram que os efeitos promovidos sobre a fermentação ruminal desapareceram após 6 dias (período de adaptação), que foi atribuído a uma provável adaptação das bactérias a estes aditivos. Dessa forma, sugerem que trabalhos realizados em curto prazo podem levar a conclusões errôneas.

SOUZA (2014) avaliou os extratos de plantas do Cerrado barbatimão e sucupira, nas doses 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L, utilizando uma dieta composta por *Brachiaria brizantha* cv. Marandu, na produção de metano, AGCC, N-NH₃ e degradabilidade *in vitro*. Nos tratamentos com extrato de barbatimão, somente a dose 400mg/L (B400) reduziu (P<0,05) o volume de metano (VCH₄) em relação ao tratamento controle (TC). Foram encontrados diferenças entre os tratamentos com sucupira e em relação ao TC. O tratamento Sucupira com 400 mg/L aumentou a concentração de acetato e metano, porém, não influenciou a DIVMS o que indica que os microrganismos que degradam fibra não foram afetados. As variações dos resultados apresentadas nos tratamentos com extrato de sucupira evidenciam a necessidade de mais estudos a fim de elucidar seus efeitos sobre os parâmetros de fermentação ruminal.

Há um grande número de espécies de plantas com potencial para diminuir a produção de metano ruminal e na maioria dos casos os efeitos benéficos foram observados em estudos *in vitro*, com variações de acordo com o tipo de composto presente (taninos, saponinas, óleos essenciais, entre outros) e a concentração destas substâncias (BODAS et al., 2012). Com isso, os possíveis mecanismos e efeitos de muitos compostos fitogênicos no processo de metanogênese não estão totalmente claros (PATRA et al., 2010).

Dessa forma, BODAS et al. (2012) sugerem que os aditivos fitogênicos reduzem a produção de metano por inibição direta do desenvolvimento das Archaea metanogênicas, redução dos processos metabólicos microbianos envolvidos na metanogênese ou ainda pelos

efeitos destes compostos na fermentação ruminal e em rotas metabólicas que possuem baixa produção de metano (como no aumento da produção de propionato).

2.5 Utilização de óleos essenciais na nutrição de ruminantes

Em estudos *in vitro* alguns óleos essenciais e seus compostos ativos foram capazes de modificar a fermentação ruminal de forma favorável com ganhos na eficiência da utilização da energia e proteína no rúmen (CALSAMIGLIA et al., 2007) o que contribuiu para o aumento nas pesquisas com o uso de óleos essenciais na nutrição de ruminantes (BUSQUET et al., 2005; BUSQUET et al., 2006 e CASTILLEJOS et al., 2006; CALSAMIGLIA et al., 2007; BODAS et al., 2012; SOUZA, 2014).

Contudo, as informações sobre o desempenho de ruminantes alimentados com óleos essenciais são escassas, isso porque muitas pesquisas *in vivo* iniciaram nesta década. Nem sempre os resultados favoráveis apresentados *in vitro* se repetem *in vivo* apesar do uso das mesmas substâncias. Isso ocorre em virtude do desconhecimento das doses adequadas, interações dos aditivos com a dieta e o ambiente ruminal, além da forma inadequada de fornecimento. A grande variação na concentração e no tipo de composto ativo presente nos óleos essenciais justificam em parte os resultados negativos já que não há padronização dos produtos (ARAUJO, 2010).

RIVAROLI (2014) avaliou o desempenho de 27 bovinos mestiços (½ Angus vs. ½ Nelore) não castrados terminados em confinamento por 130 dias recebendo dieta com relação volumoso:concentrado de 10:90 e a adição de 3,5 e 7,0 g/animal/dia de óleos essenciais formados por um mix de extratos vegetais: orégano (*Origanum vulgare*), alho (*Allium sativum*), limão (*Citrus limonium*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), tomilho (*Thymus vulgaris*), eucalipto (*Eucalyptus saligna*) e laranja doce (*Citrus aurantium*). A inclusão de 3,5 e 7,0 g/animal/dia do mix de óleos essenciais não influenciou o desempenho animal e as características de carcaça, não alterou ($P>0,05$) a ingestão de matéria seca (IMS), o peso vivo final (PVF) e o ganho de peso médio diário (GMD). O PVF e o GMD observados nesse estudo foram de 440,3 kg e 1,64 kg/dia, respectivamente.

2.6 Fermentação Ruminal *In Vitro*

Os métodos *in situ* e *in vitro* são modelos biológicos com diferentes níveis de complexidade e são utilizados em substituição a métodos *in vivo*, pois estes apresentam principalmente dificuldades de aplicação, são onerosos e não se aplicam prontamente a avaliação de um grande número de alimentos (LÓPEZ, 2005).

Os métodos de digestibilidade *in vitro* apresentam como vantagens o custo reduzido, controle ambiental satisfatório, rápida obtenção de resultados, e permite trabalhar com um número maior de tratamentos e pequenas quantidades de amostras (ARAÚJO, 2010).

De acordo com LÓPEZ (2005) os sistemas *in vitro* podem ser classificados em: cultura em massa e cultura contínua. O uso de filter bags e a metodologia de TILLEY & TERRY (1963) são exemplos de cultura em massa em que a principal aplicação é estimar a extensão da degradação no rúmen ou a digestibilidade por medidas em um único ponto final. A principal desvantagem dessa metodologia de cultura é o curto prazo em horas e médio para dias, além de não alcançar um estado de equilíbrio em virtude de não ter um padrão no crescimento microbiano, a medida que diminui o substrato e aumenta o acúmulo de resíduos da fermentação diminui a população microbiana.

A técnica de cultura contínua constitui uma forma de estudar o metabolismo ruminal em condições que mais se aproximam da fermentação ruminal *in vivo*. Nesses sistemas há a adição de solução tampão e de nutrientes regularmente além da remoção contínua dos produtos da fermentação (HOOVER et al., 1976) o que permite o estudo ser mantido por longo prazo, e é possível medir os parâmetros de fermentação, extensão da degradação da matéria seca (MS), produção dos produtos finais como os AGCCs e a síntese de proteína microbiana (LÓPEZ, 2005).

O conteúdo dos fermentadores dos sistemas de cultura contínua são compostos por líquido ruminal, alimento, solução tampão que é infundida continuamente, produtos da fermentação e microrganismos. São considerados de fluxo contínuo em virtude da entrada e saída constante de líquidos e sólidos (LÓPEZ, 2005).

São dois tipos de sistemas de cultura contínua: fluxo simples e fluxo duplo. No simples há apenas o orifício para remoção de material no qual saem líquidos e sólidos. Nos sistemas de fluxo contínuo duplo há a remoção de efluentes diferenciando os fluxos líquidos e sólidos. Assim, uma parcela do meio de fermentação é bombeada por um filtro enquanto

outra parte que consiste nas partículas sólidas, líquidos e microrganismos transborda por um orifício, possibilitando uma rápida entrada de solução tamponante para manutenção do pH, permitindo um maior tempo de permanência para a digestão de partículas sólidas (HOOVER et al., 1976).

REFERÊNCIAS

1. ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
2. ARAUJO, R. C. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
3. BENCHAAAR, C.; PETIT, H. V.; BERTHIAUME, R.; OUELLET, D. R.; CHIQUETTE, J.; CHOUNARD, P. Y. Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 2, p. 886–897, 2007.
4. BODAS, R.; PRIETO, N.; GARCÍA-GONZÁLEZ R.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F.J.; LÓPEZ, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v.176 p. 78–93, 2012.
5. BOTREL, Priscila Pereira et al. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marrubioides* EPL: cultivada no campo e em casa de vegetação. *Quím. Nova* [online]. 2010, vol.33, n.1, pp. 33-37. ISSN 0100-4042.
6. BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.94, p. 233-253, 2004.
7. BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 2, p. 761–771, 2006.
8. BUSTAMANTE, K.G.L.; LIMA, A.D.F.; SOARES, M.L.; FIUZA, T.S.; RESVENZOL, L.M.F.; BARA, M.T.F.; PIMENTA, F.C.; PAULA, J.R. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto da casca da sucupira branca (*Pterodon emarginatus* Vogel) – Fabaceae. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.12, n.3, p.341-345, 2010.
9. CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580–2595, 2007.
10. CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET A.; KAMEL, C. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, v.82, p.3230-3236, 2004.

11. CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. 2649–2658, 2006.
12. CHAO, S. C.; YOUNG, D. G.; OBERG, C. J. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*, Winston Salen, v. 12, p. 639-649, 2000.
13. DUTRA, R.C.; PITTELLA, F.; DITZ, D.; MARCON, R.; PIMENTA, D. S.; LOPES, M. T. P.; RAPOSO, N. R. B. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, João Pessoa, v.22, n.5, p. 971-978, 2012.
14. FELDBERG, R. S.; CHANG, S. C.; KOTIK, A. N.; NADLER, M.; NEUWIRTH, Z.; SUNDSTROM, D. C.; THOMPSON, N. H. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.32, n.12, p. 1763-1768, 1988.
15. HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon* spp.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 607-616, 2010.
16. HOOVER, W. H.; CROOKER, B. A.; SNIFFEN, C. J. Effects of differential solidliquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.43, n. 2, p. 528-534, 1976.
17. LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 87-121.
18. MERTENS, D. R. Rate and extent of digestion. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p.13-48.
19. MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIME NTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.15, n.4, p.316-320, 2005.
20. MOULD, F. L.; KLIEM, K. E.; MORGAN, R. et al. In vitro microbial inoculum: a review of its function and properties. *Animal Feed Science and Technology*, Amsterdam, v.123/124, n.1, p.31-50, 2005.
21. MMA. O Bioma Cerrado, 2014. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado> Acesso em: 01/09/2014.
22. NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. AND DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: *The rumen microbial ecosystem*, p. 523-632. P. N. Hobson and C. S. Stewart editors. 1997.

23. RIVAROLI, D. C; Níveis de óleos essenciais na dieta de bovinos de corte terminados em confinamento: desempenho, características da carcaça e qualidade da carne / Dayane Cristina Rivaroli. – Botucatu, 2014, 84 pag. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014.
24. SANTOS, A. P.; ZATTA, D. T.; MORAES, W. F.; BARA, M. T. F.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R.; PAULA, J. R. Composição química, atividade antimicrobiana do óleo essencial e ocorrência de esteroides nas folhas de *Pterodon emarginatus* Vogel, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, n.6, p.891-896, 2010.
25. SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v.35, n.2, p.109-115, 2005.
26. SOUZA, C.E. Utilização de compostos secundários de plantas para mitigação de metano em ruminantes. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2014.
27. TAGER L. R.; KRAUSE, K. M. Effects of essential oils on rumen fermentation, milk production, and feeding behavior in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 5, 2011.
28. TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.4, p.1561-1568, 2002.
29. ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.10, p. 4606-4610, 1999.
30. WALLACE, R. J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 63, p. 621–629, 2004

CAPÍTULO 2 – DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* EM SISTEMA DE CULTURA CONTÍNUO DE DUPLO FLUXO: O APARELHO

Sistemas de alimentação animal modernos e eficientes precisam ser fundamentados em mecanismos que determinam a resposta dos animais aos nutrientes, lidando com aspectos quantitativos da digestão e do metabolismo do ruminante (MERTENS, 2005). Estudos da concentração e digestibilidade dos componentes dos alimentos são essenciais para adotar práticas de alimentação eficazes, mas estes estudos exigem recursos consideráveis em termos de trabalho, alimentação, animais e tempo.

É consenso que, para a descrição quantitativa apropriada dos processos digestivos e metabólicos, são necessários dados biológicos que podem ser obtidos usando técnicas *in vitro* (MOULD et al., 2005), precedentes ou em substituição aos ensaios *in vivo* e *in situ*.

Teoricamente, os sistemas *in vitro*, devem ser capazes de representar o processo de digestão que ocorre no rúmen, abomaso ou intestino para estimar quantitativamente a taxa e o grau de digestão similarmente aos obtidos *in vivo* (BERCHIELLI et al., 2006). Estes sistemas podem ser usados para estudar processos individuais fornecendo informações sobre sua natureza e sensibilidade a vários fatores (LÓPEZ, 2005). A capacidade de controlar mais precisamente o ambiente *in vitro* tem levado ao desenvolvimento de técnicas alternativas, aumentando substancialmente a capacidade de pesquisa e o conhecimento da microbiologia do rúmen e dos processos bioquímicos envolvidos na fermentação ruminal.

Em sistemas de cultura contínua acontece a adição regular de tampão e de nutrientes e remoção contínua de produtos da fermentação, atingindo condições de equilíbrio que permitem o estabelecimento de uma população microbiana estável, podendo ser mantida por longos períodos (HOOVER et al., 1976). Os sistemas permitem a medição de parâmetros de fermentação, a extensão da degradação da MS, a produção de produtos finais e síntese de proteína microbiana (LÓPEZ, 2005).

Esses sistemas simulam o ambiente ruminal de maneira mais representativa que culturas batch e permitem o estudo por longo prazo (semanas) dos efeitos de fatores que afetam a população microbiana e a digestão de nutrientes em condições controladas de pH, taxa de rotatividade e ingestão de nutrientes (LÓPEZ, 2005).

A metodologia proposta por Hoover et al., 1976, consiste em um sistema de fermentação com três estações, composto por três recipientes para fermentação de vidro, que são magneticamente agitados e aquecidos por um spray de água quente com termóstato. Cada recipiente é equipado com uma entrada de solução tampão, um dispositivo de entrada de alimentação sólida, uma sonda térmica e uma entrada para gás.

Além da porta de descarga, através da qual passa tanto produtos de fermentação líquidos e sólidos, cada jarro fermentador esta equipado com um filtro para retirada de filtrado e remoção de produtos principalmente líquidos. Este sistema de dupla saída permite a remoção de líquido e sólidos com taxas diferentes. O diagrama esquemático do aparelho é apresentado na Figura 2.

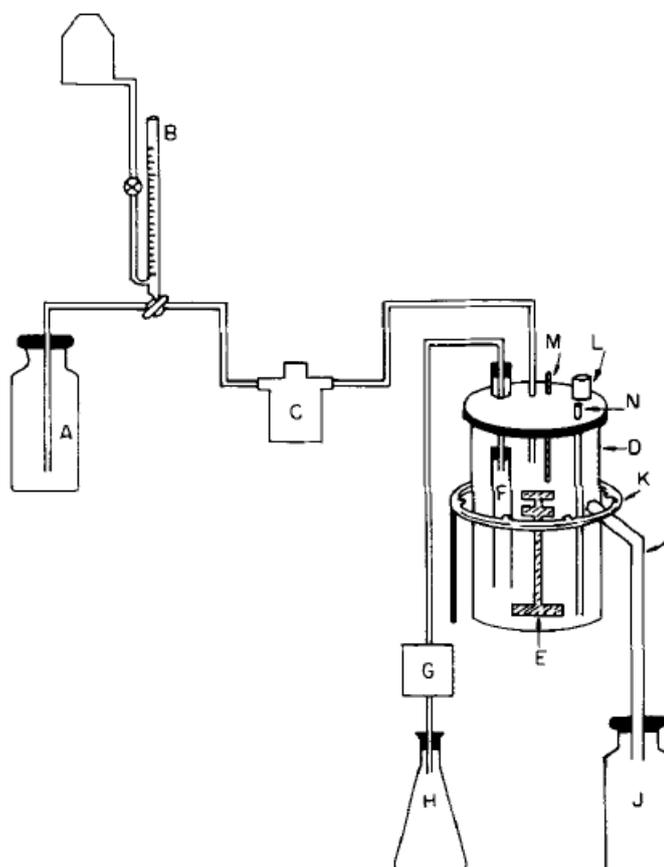


Figura 2. Aparelho de cultura contínua. A, reservatório de solução tampão; B, bureta; C, bomba peristáltica; D, jarro fermentador; E, agitador magnético; F, filtro; G, bomba peristáltica; H, reservatório de efluente filtrado; I, saída porta de descarga; J, reservatório de efluentes da porta de descarga; K, anel de aspersão de água aquecida; L, porta para entrada de alimentação; M, porta entrada para sonda térmica; N, porta de entrada de gás (Hoover et al., 1976).

A solução tampão do reservatório (A) é bombeada continuamente para o frasco fermentador D pela bomba peristáltica (C). A bureta (B) está ligada a um pequeno frasco contendo solução tampão e é usada para monitorar o bombeamento sem interromper o fluxo

para o frasco fermentador. O dispositivo de agitação magnética (E) tem lamínas de alumínio adequadamente posicionadas para atuar como um diminuidor de espuma. O conjunto do filtro (F) é facilmente inserido e removido através de um orifício de 25 mm no jarro fermentador. O meio de fermentação líquido é bombeado para reservatório de efluente (H) por uma bomba peristáltica (G). O fluxo de meio de fermentação sólida e líquida misturados através de um braço lateral (I) no reservatório de efluentes (J). Uma sonda térmica, inserida no frasco do fermentador (M), mantém a temperatura a 39°C, controlando o spray de água quente do anel de pulverização (K) que rodeia o frasco fermentador. O nitrogênio (N₂) é continuamente inoculado através do conteúdo de fermentação via sonda (N). A alimentação é realizada através do dispositivo de alimentação mecânica que inocula a ração experimental no fermentador através de um orifício de 25 milímetros em (L).

O sistema de cultura de fluxo contínuo original foi concebido e desenvolvido por Hoover et al., 1976. Um diagrama esquemático de uma versão modificada do sistema de fluxo duplo original foi apresentada por Hannah et al. 1986 e ilustrado na Figura 3. As principais modificações apresentadas pelos autores foram a diminuição do volume do frasco fermentador e a utilização de um cabo aquecedor mergulhado no líquido do interior do frasco para manter a temperatura a 39°C.

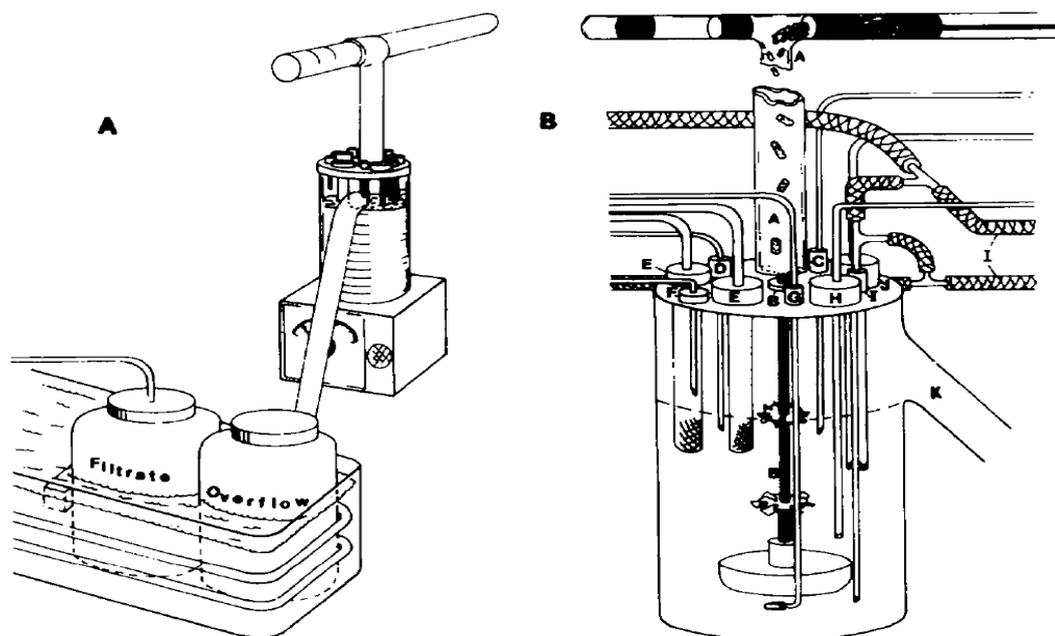


Figura 3. (A) Esquemática geral do sistema de cultura de fluxo duplo contínua. (B) Esquema de componentes do frasco fermentador: A, dispositivo de alimentação automática e porta de entrada de alimentação; B, conjunto magnético do rotor; C, porta de infusão de hidróxido de sódio; D, porta de infusão de ácido clorídrico; E, filtros;

F, porta de infusão da solução tampão; G, dispersor de nitrogênio; H, termômetro; I, aquecedor; J, eletrodo de pH; K, porta de transbordo. (Hannah et al., 1986)

O desenvolvimento do sistema de cultura de fluxo duplo contínuo do Laboratório de Nutrição Animal no Departamento de Produção Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, apoiou-se nos princípios apresentados por Hoover et al., 1976, construído e modificado a partir da metodologia apresentada por Hannah et al., 1986.

As principais modificações apresentadas no sistema brasileiro foram em relação ao sistema de aquecimento do líquido ruminal, sendo utilizadas paredes duplas de vidro nos frascos dos fermentadores, ao qual circula água quente capaz de manter a temperatura interna em 39°C. A agitação do conteúdo interno anteriormente feita por agitador magnético foi substituída por um motor giratório acoplado na parte superior da tampa e a alimentação é realizada de forma manual (FIGURA 4).

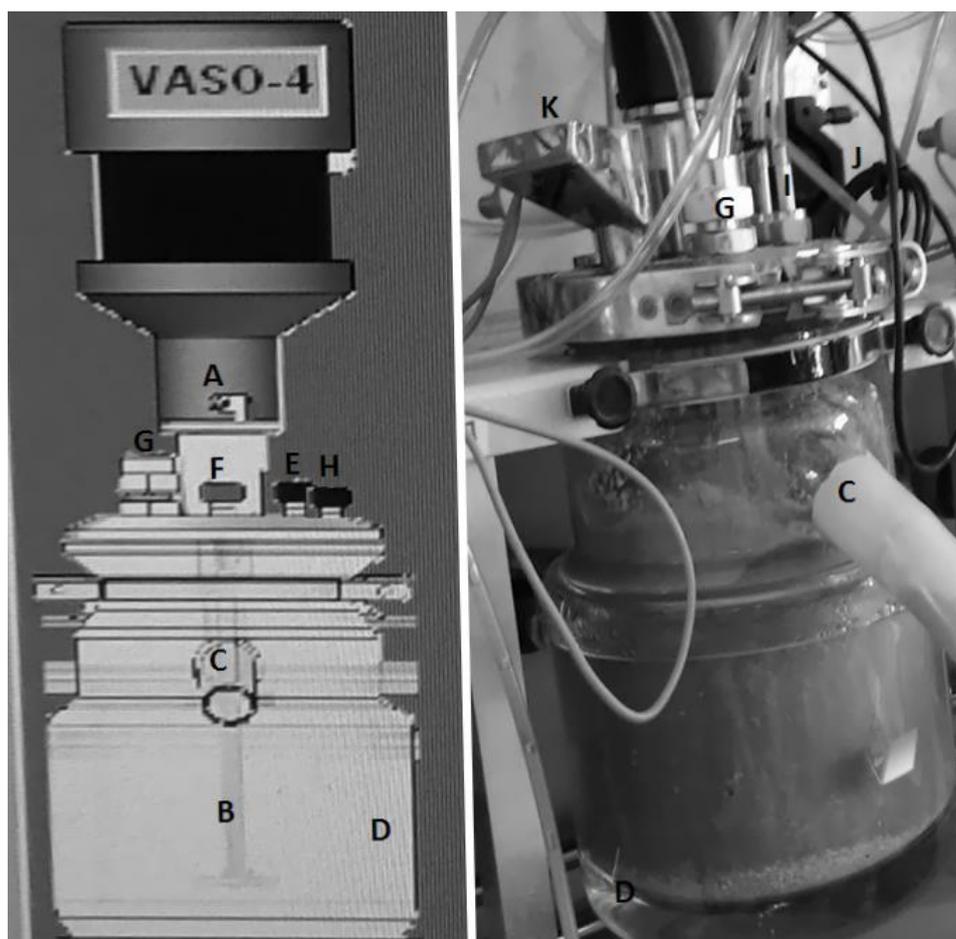




Figura 4. A, motor giratório; B, hélice giratória; C, porta de transbordo, D, paredes de vidro duplo, E, entrada solução tampão; F, eletrodo pHgâmetro; G, entrada soluções de hidróxido de sódio e ácido clorídrico; H, saída do filtrado; I, entrada gás nitrogênio (N₂); J, termômetro; K, entrada alimentação; L, proveta contendo NaOH; M, proveta contendo HCl e N, registro com manômetro do N₂.

A principal novidade deste novo aparelho é a utilização de um programa de computador que controla a rotação das quatro bombas peristálticas ligadas ao frasco do fermentador, sendo uma bomba responsável pela inoculação constante de solução tampão (saliva artificial), uma bomba esta acoplada ao filtro interno do frasco do fermentador, uma bomba adiciona solução de hidróxido de sódio e uma bomba que adiciona solução de ácido clorídrico. O equipamento foi equipado com cinco frascos de fermentação e 20 bombas peristálticas.

A adição de hidróxido de sódio ou ácido clorídrico é realizada automaticamente, através de uma programação estabelecida respeitando o intervalo de pH desejado. Os valores de pH, temperatura e velocidades das bombas peristálticas são registrados e armazenados a cada 60 segundos (FIGURA 5).



Figura 5. A, tela de trabalho do programa de computador demonstrando os cinco frascos; B, controle de velocidade da rotação do motor giratório; C, registro de pH e temperatura; D, intervalo de pH programável; E, controle velocidade bomba peristáltica solução tampão; F, controle velocidade bomba peristáltica filtro; G, controle bomba peristáltica hidróxido de sódio; H, controle velocidade bomba peristáltica ácido clorídrico.

Os procedimentos operacionais para o uso do sistema de cultura contínuo de duplo fluxo iniciam com a preparação do equipamento, antes da adição de líquido ruminal nos frascos dos fermentadores. O volume interno de cada frasco do fermentador deve ser aferido. Esta verificação deve ser realizada sempre na primeira vez que o equipamento for utilizado e sempre que houver a troca de algum dos frascos do fermentador. Para a verificação do volume de cada frasco, o mesmo deve ser pesado vazio e acoplado ao fermentador. O motor giratório e a hélice giratória devem ser acoplados ao frasco, o volume do frasco deve ser completo com água e o motor giratório deve ser ligado em 300rpm. Adiciona-se água ao frasco, com o motor ligado até o início do transbordo da água pela porta de transbordo. Retira-se o frasco do fermentador e pesa o frasco com a água. Do peso encontrado deve ser subtraído o peso do frasco vazio, sendo o peso da água equivalente ao volume do frasco. Esse procedimento deve ser realizado cinco vezes e o volume de cada frasco será a média das cinco aferições. Após a verificação do volume, cada frasco deverá ser numerado e ficar sempre em seu local não podendo trocar a posição e a sequência dos frascos no fermentador, pois o valor do volume será utilizado nos cálculos da taxa de diluição e digestibilidade.

A dieta deve ser preparada antecipadamente, em quantidade suficiente para todo o experimento, utilizando 10 dias por período experimental, oito dias de período experimental,

acrescido dois dias no período caso seja necessário. Todos os ingredientes da dieta devem ser moídos em peneiras de dois milímetros.

Para o preparo da solução de saliva artificial (WELLER & PILGRIM, 1974), preparar mistura de reagentes necessários para 50 litros de solução, em quantidade suficiente para todo o período experimental. Todos os reagentes para o preparo da solução de saliva artificial devem passar por peneira para facilitar a dissolução. A solução de saliva artificial contém 0,4g/litro de ureia para simular a reciclagem de nitrogênio. Preparar todas as soluções de ácido clorídrico (HCl) 3N e hidróxido de sódio (NaOH) 5N que serão utilizados no período experimental, essa quantidade vai depender do pH desejado e de quão acidogênica será a dieta experimental.

Todo o equipamento deve ser montado e todo material utilizado, as provetas das soluções de HCl e NaOH, os frascos coletores dos fluxos do filtro interno e do transbordo, o banho-maria de aquecimento, o sistema de refrigeração dos frascos coletores, os pHímetros, os termômetros internos, os equipamentos de coletas de amostras e separação do pelet bacteriano devem ser separados e identificados, sendo necessário uma verificação em todas as bombas peristálticas conferindo seu funcionamento, de todo sistema de magueiras e de injeção de gás nitrogênio (N₂).

No dia do início do experimento, antes da incubação do líquido ruminal, todo o equipamento deve ser preparado. As provetas das soluções de HCl e NaOH devem ser preenchidas, o sistema de aquecimento dos frascos deve ser ligado para manter a temperatura em 39°C, os pHímetros devem ser calibrados, antes e a cada 48 horas durante o experimento. O sistema de injeção de gás nitrogênio (N₂) deve ser ligado a uma taxa de 40ml/minuto, garantindo um ambiente de anaerobiose nos frascos.

Após a colheita do líquido ruminal, antes da incubação nos frascos, uma amostra deve ser retirada para análise da temperatura, pH, ácidos graxos de cadeia curta e amônia. Para a incubação do líquido ruminal nos frascos, os mesmos devem ser preenchidos até a metade do volume, um terço da dieta fornecida diariamente, referente ao tratamento controle, deve ser adicionado em cada frasco e o restante do líquido deve complementar o volume de cada frasco até o início do transbordo, com o motor giratório ligado em uma rotação de 300rpm.

Após a inoculação do líquido ruminal não diluído, ligar o sistema de controle de pH no intervalo pré-definido no programa, ligar as bombas peristálticas responsáveis pela inoculação da saliva artificial e a bomba responsável pela sucção do material pelo filtro

interno. As taxas de diluição dos fermentadores devem mantidas em condições constantes de 5%/h para a fração líquida, que será realizada pelo filtro interno ao fermentador acoplado a uma bomba peristáltica e 5%/h para a fração sólida, que era realiza pelo escape pela porta de transbordo do material devido ao enchimento do frasco pela saliva artificial.

As dietas experimentais devem ser fornecidas diariamente, divididas em três refeições com intervalo de oito horas, totalizando o fornecimento de 100 g de MS para cada frasco do fermentador. Em todos os horários de alimentação deve ser verificados e anotados o gasto de HCl e NaOH sendo as provetas sempre preenchidas após a verificação. Verificar visualmente a temperatura, o pH de cada frasco, a infusão de gás N₂ e o sistema de mangueiras.

O período experimental consiste de oito dias, divididos em cinco dias de adaptação e três dias de coletas. Durante a adaptação regula-se o fluxo de saída da parte sólida e da parte líquida para 5%/h e descarta o conteúdo recolhido diariamente. Durante os dias de coletas, o conteúdo recolhido, parte sólida e parte líquida, serão mantido em ambiente com temperatura de 4°C para retardar o crescimento microbiano. No final de cada dia do período de coleta, estando os fluxos da parte sólida e da parte líquida dentro do intervalo de 5%/h com uma margem de erro aceitável de 10%, os efluentes sólidos e líquidos de cada dia do período de coleta, serão misturados e homogeneizados por 1 min para retirada de 500 mL por aspiração. sendo que no fim dos três dias de coletas teria uma amostra de 1500ml de cada fermentador, que são misturadas e homogeneizadas. Desta amostra composta são retiradas subamostras para a realização de análises de proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV). O restante será congelada a temperatura de -80°C em recipientes metálicos e secas em liofilizador para análises de teor de MS, cinzas, PB, FDN e FDA e bases puricas.

No último dia do período experimental, separava-se o pelet bacteriano do conteúdo interno de cada frasco do fermentador, alguns procedimentos para evitar alterações na integridade da célula microbiana são realizados segundo MINATO e SUTO, 1978. A separação das bactérias são obtida pela filtração do conteúdo do fermentador, após inclusão de 100ml da solução de 2% de metilcelulose em solução salina 0,85% e esferas de vidro (15 de 4mm e 30 de 2mm) com agitação por uma hora em temperatura de 39°C e agitação por 24h em temperatura aproximada de 4°C para liberação lenta das bactérias aderidas as partículas. Após a agitação a frio por 24h, a remoção dos resíduos sólidos com lavagem utilizando solução salina e filtragem com pano de filtro. O filtrado será centrifugado por

10min a 1000g para remoção de resíduos de alimentos. A fração sobrenadante será centrifugada duas vezes por 20min a 20000g para isolar as bactérias, após lavagem com solução salina por duas vezes e com água destilada uma vez, finalizando o processo para a obtenção do pelet bacteriano.

Os cálculos das taxas de fluxo dos fermentadores são apresentados de acordo com Stern e Endres, (1991).

Taxa de diluição líquida (TDL): objetivo 10%/h

Taxa de diluição sólida (TDS): objetivo 5%/h

$$\% \text{ TDL} = \frac{\text{filtrado (ml/h)} + \text{transbordado (ml/h)}}{\text{volume do frasco do fermentador}} \times 100$$

$$\% \text{ TDS} = \frac{\text{transbordado (ml/h)}}{\text{volume do frasco do fermentador}} \times 100$$

Digestibilidade aparente da Matéria Seca (DAMS):%

$$\text{DAMS} = \frac{\text{g MS dieta} - (\text{g MS efluente} - \text{g MS saliva})}{\text{g MS dieta}} \times 100$$

Digestibilidade verdadeira da Matéria Seca (DVMS):%

$$\text{DAVMS} = \frac{\text{g MS dieta} - (\text{g MS efluente} - \text{g MS saliva} - \text{g MS bacteriana})}{\text{g MS dieta}} \times 100$$

Digestibilidade aparente da Matéria Orgânica (DAMO):%

$$\text{DAMO} = \frac{\text{g MO dieta} - \text{g MO efluente}}{\text{g MO dieta}} \times 100$$

Digestibilidade verdadeira da Matéria Orgânica (DVMO):%

$$\text{DAMO} = \frac{\text{g MO dieta} - (\text{g MO efluente} - \text{g MO bacteriana})}{\text{g MO dieta}} \times 100$$

$$\text{Produção g MS bacteriana} = \frac{\text{g efluente N bacteriano}}{\% \text{ N bacteriano (base na MS)}}$$

$$\text{Produção g MO bacteriana} = (\text{g MO bacteriano efluente}) \times (\% \text{ MO bacteriano})$$

Nitrogênio (N) Total ingerido (NTI):g

$$\text{NTI} = (\text{g N dietético}) + (\text{g N ureico infundido via saliva artificial})$$

Infusão de Nitrogênio Ureico/Dia (NUI):g

$NUI = (\text{g ureia/L de saliva}) \times (\text{volume de saliva infundido, em litros}) \times (\% \text{ de N na ureia}^*)$

* Utilizar números decimais. Ex.: 0,4672

Efluente Total de Nitrogênio (ETN): g

$ETN = (\% \text{ N efluente}) \times (\text{g total efluente/dia})$

Nitrogênio Recuperdo (NR):%

$\%NR = \frac{\text{g N efluente total}}{\text{g N ingerido total}}$

Efluente Nitrogenio Amoniacal(ENA):g

$ENA = (\text{mg N amoniacal/100 ml} \times \frac{\text{Total efluente (ml)}}{100 \text{ ml}}) / 1000$

Efluente Nitrogênio Não Amoniacal (ENNA): g

$ENNA = (\text{g efluente total de N}) - (\text{g efluente n amoniacal})$

Nitrogênio Bacteriano no Efluente Total de Nitrogênio (NBTN): % (purina como marcador)

$NBTN = \frac{\text{efluente purina (mg/g N total)}}{\text{purina bacteriana (mg/g N)}} \times 100$

$\text{Purina bacteriana (mg/g N)} = \frac{\text{purina bacteriana (mg/g MS)}}{\% \text{ N na bacteria (base MS)}}$

$\text{Efluente purina (mg/g N total)} = \frac{\text{efluente purina (mg/g MS)}}{\% \text{ N na MS efluente}}$

$\% \text{ N na MS efluente} = \frac{\% \text{ N efluente}}{\% \text{ MS efluente}} \times 100$

Efluente Nitrogenio Bacteriano (ENB):g

$ENB = (\text{g efluente N total}) \times (\% \text{ N bacteriano no efluente N total})$

Efluente Nitrogenio Dieta (END): g

$$\text{END} = (\text{g efluente ENNA}) - (\text{g efluente N bacteriano})$$

Degradação Proteína Bruta (DPB): %

$$\text{DPB} = \frac{(\text{g N deita ingerido}) - (\text{g efluente N dieta})}{\text{g N deita ingerido}} \times 100$$

Eficiência Síntese Bacteriana

g N bacteriano / Kg MS ou MO verdadeiramente digerida=

$$\frac{\text{g efluente N bacteriano}}{\text{g MS ou MO verdadeiramente digerida}} \times 1000$$

g MS ou MO verdadeiramente digerida= (g MS ou MO ingerido) x (%
digestibilidade verdadeira da MS ou MO)

Calculos para os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC)

Fluxo individual AGCC, mmoles/dia= (mM) x (volume efluente (litros))

Fluxo Total AGCC= (mM total AGCC) x (volume efluente (litros))

$$\text{moles}/100 \text{ moles} = \frac{\text{mM idividual AGCC}}{\text{mM total AGCC}} \times 100$$

Digestibilidade da Fibra (DF): %

$$\text{DF} = \frac{\text{g fibra ingerida} - \text{g fibra efluente}}{\text{g fibra ingerida}} \times 100$$

Digestibilidade Carboidrato Não Estrutural Total (DCNET): %

$$\text{DCNET} = \frac{\text{g CNET ingerido} - \text{g CNET efluente}}{\text{g CNET ingerido}} \times 100$$

CAPÍTULO 3 – EXTRATO BRUTO DE *PTERODON EMARGINATUS* VOGEL (SUCUPIRA) COMO MANIPULADOR DA FERMENTAÇÃO MICROBIANA RUMINAL: DIGESTIBILIDADE *IN VITRO* EM SISTEMA DE CULTURA CONTÍNUO DE DUPLO FLUXO

INTRODUÇÃO

Um dos mais bem sucedido exemplo de como a manipulação de fermentação ruminal contribui para o aumento do desempenho animal foi o uso de ionóforos, porém cresce a preocupação dos consumidores, havendo receio de se consumir alimentos produzidos com antibióticos.

Com o propósito de substituir os ionóforos, os extratos de plantas têm sido amplamente estudados, já que alguns países têm proibido o emprego destes produtos como promotores de crescimento.

O Cerrado é rico em espécies de plantas com valor fitoterápico. No entanto, são escassos os estudos voltados para a identificação de plantas úteis deste bioma, principalmente como produtos destinados à animais.

A composição biológica destas espécies as fazem úteis a serem empregadas na nutrição animal. A identificação da dose adequada é um desafio e o desconhecimento do efeito dessas espécies de plantas no animal faz-se necessário.

Sistemas de alimentação modernos e eficientes precisam ser fundamentados em mecanismos que determinam a resposta dos animais aos nutrientes, lidando com aspectos quantitativos da digestão e do metabolismo do ruminante (MERTENS, 2005). Estudos da concentração e digestibilidade dos componentes dos alimentos são essenciais para adotar práticas de alimentação eficazes, mas estes estudos exigem recursos consideráveis em termos de trabalho, alimentação, animais e tempo. É consenso que, para a descrição quantitativa apropriada dos processos digestivos e metabólicos, são necessários dados biológicos que podem ser obtidos usando técnicas *in vitro* (MOULD et al., 2005), precedentes ou em substituição aos ensaios *in vivo* e *in situ*.

Com o objetivo de avaliar o efeito de doses do extrato bruto de Sucupira na fermentação ruminal propôs se a aplicação e avaliação de um sistema de cultura de fluxo contínuo na realização do estudo *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local

A extração do bioproduto, extrato bruto de *Pterodon emarginatus* Vogel (Sucupira) e seu processamento foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG).

O ensaio de digestibilidade *in vitro* em cultura contínua de fluxo duplo foi realizado no departamento de Produção Animal (DPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da UFG.

2.2 Tratamentos e dietas experimentais

Os tratamentos foram constituídos de quatro doses: 0%; 0,06%; 0,12%; 0,24% na matéria seca (MS) da dieta fornecida do extrato bruto em estudo (TABELA 1) e um tratamento com Monensina Sódica (30 ppm).

A dieta experimental foi formulada com o auxílio do programa NRC (2001), para atender os requerimentos nutricionais de uma vaca em lactação, com 600 Kg de peso vivo (PV) e com produção diária de 30 kg de leite. A composição bromatológica dos ingredientes utilizados estão demonstrados na TABELA 2. A silagem de sorgo, após seca em estufa de ventilação forçada a 55°C, o milho e o farelo de soja foram moídos em peneira de 2mm.

Devido a consistência oleosa do extrato bruto de Sucupira utilizou-se os ingredientes amido de mandioca e maltodextrina como veiculos no preparo de um premix com 18% de extrato bruto de sucupira, 72% de amido de mandioca e 10% de maltodextrina.

TABELA 1 – Proporção dos ingredientes das dietas experimentais.

Componentes, %MS	Tratamentos				
	MON	0%	0,06%	0,12%	0,24%
Silagem de sorgo	35,66	35,66	35,66	35,66	35,66
Milho grão	27,00	27,00	27,00	27,00	27,00
Farelo de soja	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00
Supl. Mineral*	0,70	0,70	0,70	0,70	0,70
Amido de mandioca	9,40	9,40	9,40	9,40	9,40
Maltodextrina	1,24	1,24	1,24	1,24	1,24
Extrato de Sucupira	0,00	0,00	0,06	0,12	0,24
Monensina Sódica	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00

*Níveis dos minerais do suplemento: Ca=189g/Kg, P=100g/Kg, Na=96g/Kg, Mg=18g/Kg, S=25g/kg, Co=190mg/Kg, Cu=1500mg/Kg, I=182mg/Kg, Mn=1500mg/Kg, Se=30mg/Kg, Zn=4500mg/Kg e F=900mg/Kg.

TABELA 2 – Análises bromatológicas dos ingredientes experimentais.

Ingredientes	MS, %	PB, %	FDN, %	FDA, %
Silagem de sorgo	93,73	6,04	49,56	25,71
Milho grão	89,78	7,28	8,23	0,81
Farelo de soja	88,79	47,08	12,32	5,62
Supl. Mineral	99,95	-	-	-

2.3 Período Experimental

O período experimental teve duração de 80 dias entre os meses de fevereiro a abril de 2014. O ensaio foi sub-dividido em dois sub-períodos de 40 dias, com 10 dias de ensaio de digestibilidade e 30 dias de processamento e análises laboratoriais.

2.4 Sistema de Cultura em Fluxo Contínuo

Para o desenvolvimento do ensaio *in vitro* de fermentação ruminal em sistema de cultura de fluxo contínuo utilizou-se metodologia proposta por Hoover et al.,(1976) e modificações propostas por (MOULD et al., 2005), foram utilizados 10 frascos fermentadores com volume individual aproximado de 1400ml.

Os fermentadores foram inoculados com uma mistura de fluido ruminal não diluído colhido de quatro bovinos machos da raça Nelore canulados no rúmen, que

receberam dieta com a mesma proporção volume:concentrado das dietas experimentais durante 14 dias antes da colheita do fluido ruminal.

As dietas experimentais eram fornecidas diariamente, divididas em três refeições com intervalo de oito horas (6h, 14h e 22h), totalizando o fornecimento de 100 g de MS para cada fermentador.

A temperatura interna era mantida constante (39°C) através de sistema de paredes duplas de vidros nos frascos dos fermentadores por onde passava água quente corrente e o pH era controlado para permanecer no intervalo de 6,38 – 6,42 através da infusão automática de soluções de ácido clorídrico (HCl) 3N e hidróxido de sódio (NaOH) 5N.

As médias do pH e da temperatura são demonstradas na TABELA 3. Os resultados demonstram que o objetivo de manter o pH constante entre 6,38-6,42 foi alcançado e a temperatura média ficou próxima do objetivo de 39°C, não havendo diferenças entre as médias.

TABELA 3 - Médias de pH e Temperatura do líquido ruminal dos fermentadores.

Variável	Tratamento						EPM	P valor
	MON	CON	0,06%	0,12%	0,24%			
pH	6,38	6,38	6,38	6,4	6,39	0,0123	0,2778	
T°C	38,41	38,20	38,33	38,35	38,40	0,0144	0,8457	

EPM= erro padrão da média

A condição de anaerobiose era mantida pela infusão contínua de gás nitrogênio (N₂) a uma taxa aproximada de 40ml/min. A solução tampão ou saliva artificial (Weller and Pilgrim, 1974) era continuamente infundida nos frascos fermentadores e continha 0,4 g/l de ureia para simular a reciclagem do nitrogênio (N), o fluxo de entrada de saliva artificial era de 10%/h do volume do fermentador. sendo que a infusão da saliva artificial também possuía a função de manter o fluxo contínuo de saída da fração sólida e a fração líquida saía através da sucção e filtragem.

As taxas de diluição dos fermentadores eram mantidas em condições constantes de 5%/h para a fração líquida, que era realizada pelo filtro interno ao fermentador acoplado a uma bomba peristáltica e 5%/h para a fração sólida, que era realizada pelo escape pela porta de transbordo do material devido ao enchimento do frasco pela saliva artificial.

2.5 Colheita de amostras

O período experimental consistia de oito dias, sendo cinco dias de adaptação e três dias de coletas. Durante a adaptação regulava-se o fluxo de saída da fração sólida e da fração líquida para 5%/h e descartava-se o conteúdo recolhido diariamente. Durante os dias de coleta a fração sólida e fração líquida do conteúdo recolhido foram mantidos em ambiente com temperatura de 4°C para retardar ou paralisar o crescimento microbiano.

No final de cada dia do período de coleta, estando os fluxos, da fração sólida e da fração líquida, dentro do intervalo de 5%/h, com margem de erro aceitável de 10%, colhia-se o material de cada fermentador (fração sólida e fração líquida) que eram misturados, homogeneizados por um minuto com auxílio de um homogenizador elétrico e uma amostra de 500 ml era coletada por aspiração, sendo que no final dos três dias de coletas teria uma amostra composta de 1500ml de cada fermentador, que eram homogeneizadas e antes de serem congeladas eram retiradas subamostras para a realização de análises de proteína bruta (PB), nitrogênio amoniacal (NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGCC). Três subamostras de aproximadamente 200g cada, eram congeladas em recipientes metálicos e secas em liofilizador para análises de teor de MS, cinzas, FDN e FDA.

2.6 Análises Laboratoriais

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Produção da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Os ingredientes da dieta e do filtrado dos fermentadores foram analisados para determinação de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), extrato etéreo (EE); proteína bruta (PB), segundo AOAC (1990). As análises de FDN e FDA foram realizadas segundo a metodologia sequencial descrita por CAMPOS et al. (2004) e com adição de amilase termoestável.

A digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA foram calculadas pela diferença entre a quantidade fornecida e a quantidade contida na amostra da mistura do substrato extraído nos três dias de coletas. Para a digestibilidade da MS subtraiu-se a MS introduzida via saliva.

$$\text{Digestibilidade MS} = \frac{\text{g MS oferecido} - (\text{g MS efluente} - \text{g MS saliva}) \times 100}{\text{g MS oferecido}}$$

$$\text{Digestibilidade MO, FDN e FDA} = \frac{\text{g oferecido} - \text{g efluente} \times 100}{\text{g oferecido}}$$

As análises das concentrações de AGCC's foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ, Piracicaba-SP e as concentrações de AGCC's foram determinadas por cromatografia gasosa de acordo com metodologia descrita por JOUANY (1982).

2.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental realizado foi em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições e cinco tratamentos. Os tratamentos foram sorteados aleatoriamente entre os cinco fermentadores de cada bloco.

Empregou-se o seguinte modelo de análise estatística:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \beta_j + e_{ij}$$

Em que:

Y_{ij} : é o valor observado;

μ : média geral;

t_i : é o efeito do tratamento i ;

β_j : é o efeito do bloco j ;

e_{ij} : é o erro experimental.

As médias de todas as variáveis avaliadas entre todos os tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey nível de significância 5% e as médias entre os tratamentos referentes as doses do extrato bruto de Sucupira foram submetidos à análise de regressão polinomial por meio do software R (The R Development core Team, 2012).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Extrato bruto de Sucupira

A constituição química do óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* tanto do processo de extração por hidrodestilação em aparato tipo Clevenger quanto do processo de extração por arraste a vapor está descrita na TABELA 4.

O óleo de Sucupira é constituído de monoterpenos, diterpenos e principalmente sesquiterpenos, os quais conferem atividade biológica a este bioproduto (COELHO et al., 2001; SILVA et al., 2005; POLO et al., 2004; HANSEN et al., 2010; DUTRA et al., 2012).

O rendimento médio do processo de obtenção do óleo essencial dos frutos de sucupira foi de 1,66% em relação à massa inicial através do processo de hidrodestilação em aparato tipo Clevenger e de 1,06% no equipamento de arraste a vapor. O perfil químico do óleo essencial foi composto apenas por compostos sesquiterpênicos sendo que do total, de acordo com a média entre os dois processos extrativos 70,73% são hidrocarbonetos sesquiterpênicos e 27,84% são sesquiterpenos oxigenados. Os compostos não identificados somaram 1,52%. Os constituintes majoritários foram β -cariofileno (20,30%), β -elemeno (16,58%), espatulenol (13,79%), dauca-5,8-dieno (9,81%), óxido de cariofileno (8,33%), α -copaeno (4,74%) e α -humuleno (4,63%) (FIGURA 6). Os resultados da análise centesimal das sementes de *P. emarginatus* estão descritas na TABELA 5. (Alves, 2012).

TABELA 4 - Composição química do óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus*.

Constituinte	Processo de extração	
	Hidrodestilação (%) Relativa no OE	Arraste a vapor (%) Relativa no OE
Não Identificados	0,81	2,24
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	62,64	78,62
Sesquiterpenos Oxigenados	36,54	19,14

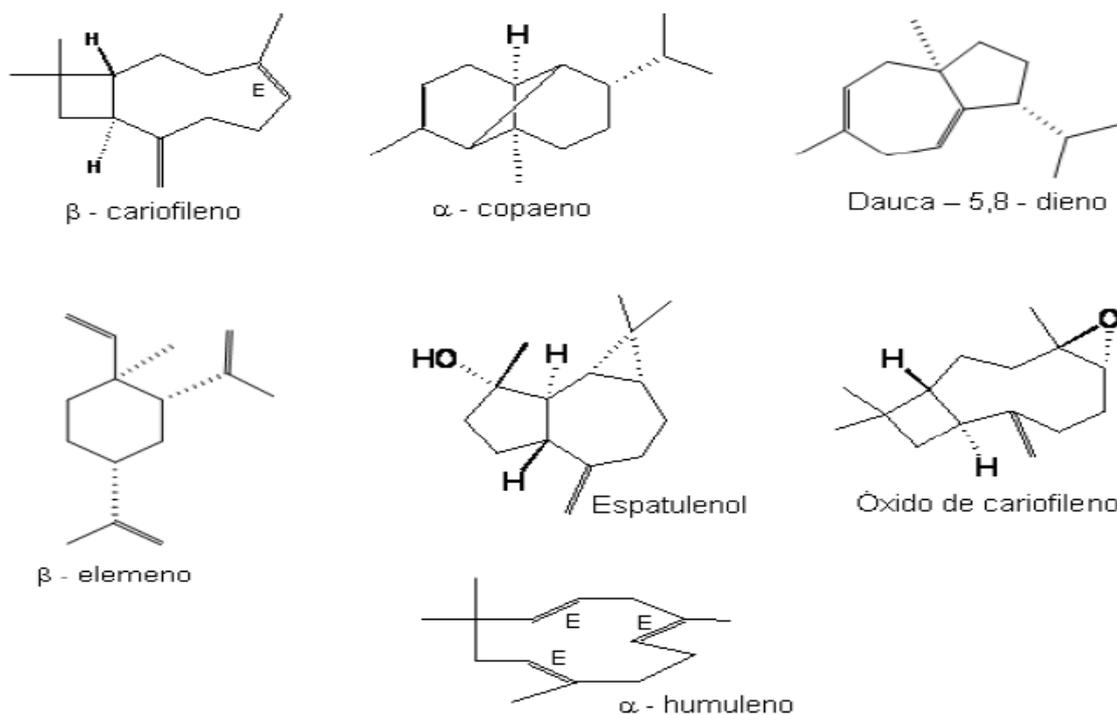


Figura 6. Constituintes majoritários do óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* Vogel. (ALVES, 2012)

TABELA 5 – Resultados da análise centesimal das sementes de *P. emarginatus*.

Análise	Resultado
Teor de Umidade (%)	6,08
Cinzas (%)	0,64
Lipídios (%)	22,85
Proteínas (%)	2,96
Carboidratos (%)	64,34
Valor total calórico (Kcal/ 100g)	506,40

3.2 Digestibilidade

A digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA são demonstradas na TABELA 6. Houve diferença ($P < 0,05$) na digestibilidade da MS e MO entre o tratamento 2,4% do extrato de sucupira e os tratamentos controle e monensina. A dose 2,4% do extrato elevou a DMS e DMO, provavelmente pela ação antibiótica dos compostos do extrato que promoveram a seleção de microorganismos, proporcionando um ambiente ruminal favorável ao grupo de microorganismos, modulando a fermentação ruminal que ocasionou no aumento na DMS e DMO. Não se observou diferenças ($P > 0,05$) na digestibilidade da FDN e FDA.

TABELA 6 - Digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA.

Variável	Tratamento					EPM	P valor
	MON	CON	0,06%	0,12%	0,24%		
Dig. MS, %	39,92b	41,57b	44,68ab	46,66ab	48,96a	1,56	0,0092
Dig. MO, %	26,04c	29,85bc	32,54ab	32,50ab	34,79a	1,09	0,0012
Dig. FDN, %	27,52	24,77	33,64	31,18	42,74	4,39	0,1002
Dig. FDA, %	17,51	17,09	26,03	18,59	32,99	5,11	0,1861

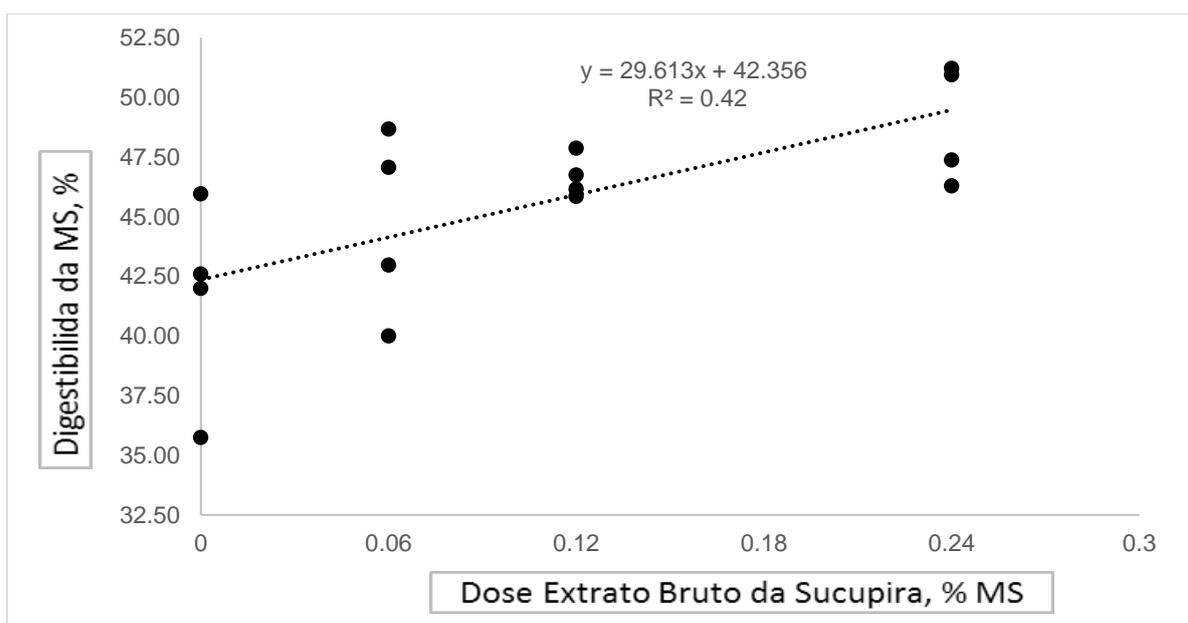
Dig. MS=digestibilidade aparente da MS; Dig. MO=digestibilidade aparente da MO; Dig. FDN=digestibilidade da FDN; Dig. FDA=digestibilidade daFDA; Dig. PB=digestibilidade da PB. EPM=Erro padrão da media. Numeros seguidos de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem-se pelo teste Tukey nível de significância 5%.

Observa-se um efeito linear na digestibilidade da MS, MO, FDN e FDA com o aumento da dose do extrato bruto de Sucupira (TABELA 7 e FIGURA 7).

TABELA 7 – Média, efeitos de ordem linear (L) e quadrático (Q) da Dig. MS, Dig. MO, Dig. FDN e Dig. FDA com diferentes doses do extrato bruto de sucupira.

Variável	Tratamento				Efeito (P valor)	
	CON	0,06%	0,12%	0,24%	L	Q
Dig. MS, %	41,57	44,68	46,66	48,96	0,003 ¹	0,410
Dig. MO, %	29,85	32,54	32,50	34,79	0,009 ²	0,608
Dig. FDN, %	24,77	33,64	31,18	42,74	0,005 ³	0,948
Dig. FDA, %	17,09	26,03	18,59	32,99	0,050 ⁴	0,611

Dig. MS=digestibilidade aparente da MS; Dig. MO=digestibilidade aparente da MO; Dig. FDN=digestibilidade da FDN; Dig. FDA=digestibilidade daFDA; Dig. ¹ $y = 29.613x + 42.356$ ($R^2 = 0.4238$); ² $y = 18.6x + 30.469$ ($R^2 = 0.3524$); ³ $y = 67.362x + 26.005$ ($R^2 = 0.3901$); ⁴ $y = 56.058x + 17.787$ ($R^2 = 0.1819$).

**Figura 7.** Regressão entre a digestibilidade da MS e as doses do extrato bruto de Sucupira.

Resultados que não corroboram com Lemos (2013), que em estudo *in vitro* utilizando a incubadora TE-150 (TECNAL), testando diferentes doses do extrato bruto de Sucupira (0, 30, 300 e 3000 mg/L), tendo a dieta experimental uma relação volumoso:concentrado de 50:50, observou uma diminuição da digestibilidade da matéria seca com o aumento da dose do extrato respectivamente (87,3; 86,1; 84,1 e 66,3%).

Souza (2013) avaliou a fase fermentativa da técnica de digestibilidade *in vitro* validada por Holden (1999) para a descrição da cinética de degradação ruminal da matéria seca (MS) da dieta experimental uma relação volumoso:concentrado 15:85, com diferentes doses (0, 30, 300 e 3.000 mg /L de fluido ruminal) do extrato bruto da sucupira. Neste estudo a adição de 30, 300 e 3.000 mg /L de óleo bruto de sucupira não alterou nenhum dos parâmetros avaliados. No entanto, a fração indegradável tendeu a aumentar ($P=0,08$) com adição da dose 3.000 ppm.

Tekippe et. al., (2013) conduziram três experimentos para avaliar os efeitos da adição de óleo essencial a base de eugenol e cinnamaldehyde (525mg/dia), na fermentação ruminal, digestibilidade, emissão de gases, perdas de N e desempenho de vacas leiteiras. Nos parâmetros produtivos não houve diferenças no CMS, produção de leite e na composição do leite, em exceção do nitrogênio uréico no leite (NUL) cuja concentração foi maior no leite das vacas que receberam tratamento com óleo essencial comparado com o controle (9,5 e 8,3mg/dL).

Neste mesmo estudo não foram observadas diferenças no pH ruminal, concentração total de AGCC e contagem de protozoários, porém observaram diferença ($P<0,001$) na concentração de N-NH₃ ruminal de vacas que receberam o tratamento com óleo essencial comparadas com o grupo controle (9,8 e 6,0 mg/dL), respectivamente.

Em relação a digestibilidade da MS, MO e FDA os autores relatam que não foram afetados pelo tratamento porém a digestibilidade da FDN foi maior ($P<0,05$) para o grupo de animais que receberam tratamento com óleo essencial comparados com o controle (37,4 e 34,3%). Os autores concluíram que de modo geral, os resultados dos estudos indicam efeitos marginais com o uso do óleo essencial testado na dose de 525mg/dia na fermentação ruminal e mostram um aumento consistente na digestibilidade da FDN, o que não corroborou com trabalho realizado, pois não se observou diferenças entre as digestibilidades da FDN e FDA e foi observado diferenças na digestibilidade da MS e MO com o aumento das doses do extrato de Sucupira.

Souza (2014) avaliou o efeito *in vitro* de metabólitos secundários de plantas do cerrado brasileiro (barbatimão e sucupira) na degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), volume de metano por grama de matéria seca degradada (VCH4/DIVMS), no volume de metano (VCH4), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH3) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), sendo as doses avaliadas foram 0 (TC), 100, 200, 300, 400 e 600 mg/L de solução para barbatimão (B100, B200, B300, B400 e B600) e para sucupira (S100, S200, S300, S400 e S600).

O autor não observou efeito dos tratamentos sobre a digestibilidade *in vitro* MS o que não corroborou com o presente trabalho onde a dose 0,24% ocasionou um aumento na digestibilidade da MS e MO em relação aos tratamentos controle e monensina.

O autor concluiu que mais estudos devem ser realizados para elucidar os efeitos desses extratos sobre os parâmetros de fermentação ruminal devido a inconsistência dos valores encontrados nos resultados dos parâmetros avaliados.

Nos estudos de CASTILEJOS et al. (2006) e FRASER et al. (2007) observaram-se que 500 ppm de Timol e Cinamaldeído reduziram o desaparecimento da MS. Segundo Souza (2013) compostos isolados de óleos essenciais (OE) mostraram ser capazes de influenciar a degradabilidade ruminal da MS.

Macheboeuf et al., (2008) avaliaram os efeitos de cinco fontes de óleos essenciais (*Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, timol de *O. vulgare*, *Cinnamomum verum*, e *Anethum graveolens*) e três constituintes puros (thymol, carvacrol e cinnamaldehyde) na resposta do ecossistema microbiano do rúmen *in vitro*. Os autores avaliaram a concentração de AGCC, amônia e gases. Concluíram que os tratamentos com as concentrações mais baixas de óleos essenciais podem ser usados como aditivos para manipular a fermentação no rúmen e diminuir a degradação da proteína ruminal, sem efeitos adversos no metabolismo energético.

3.3 Ácidos graxos de cadeia curta

As concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta ácido acético (C2), ácido propiónico (C3) e ácido butírico (C4), relação entre os ácidos C2 e C3 (C2/C3) e a concentração total estão demonstradas na TABELA 8. A concentração do C2 foi afetada pelos tratamentos, observando diminuição da concentração para o tratamento 0,24%

comparado com o tratamento controle. O mesmo ocorreu com a relação C2/C3, onde o tratamento 0,24% ocasionou uma menor relação comparado com os tratamentos controle e 0,06%. Uma provável explicação para o ocorrido seria o efeito deletério dos componentes do extrato bruto de sucupira sobre as bactérias celulolíticas, as quais são responsáveis pela fermentação dos componentes fibrosos da dieta e as principais produtoras de C2.

TABELA 8 – Concentrações dos AGCC e relação C2/C3.

Variável	Tratamento					EPM	P valor
	MON	CON	0,06%	0,12%	0,24%		
C2, mMol/mL	37,43 ^{ab}	46,61 ^a	40,51 ^{ab}	36,21 ^{ab}	29,03 ^b	3,19	0,02
C3, mMol/mL	19,30	21,95	19,19	20,04	18,31	1,82	0,69
C4, mMol/mL	11,23	13,35	14,06	12,78	10,48	1,52	0,47
C2/C3	1,93 ^{ab}	2,16 ^a	2,12 ^a	1,81 ^{ab}	1,55 ^b	0,11	0,01
Total, mMol/mL	76,49	91,07	83,20	77,97	66,92	5,95	0,13

C2; C3; C4; C2:C3; Total AGCC. EPM=Erro padrão da média. Numeros seguidos de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem-se pelo teste Tukey nível de significância 5%.

As concentrações de C2 e a relação C2/C3 foram afetados pelas doses do extrato de Sucupira. O aumento dos níveis de extrato acarretou em menores concentrações de C2 e menor relação C2/C3. Resultados benéficos ao metabolismo energético ruminal, pois as rotas metabólicas para a produção de C2 também favorecem a produzir mais gás metano o que acarreta perda energética. Porém com o aumento dos níveis de extrato também ocasionou menor concentração total dos AGCC (TABELA 9) e (FIGURA 8).

Com o aumento da dose do extrato ocorreu redução da concentração de acetato, supostamente devido a atividade inibitória sobre bactérias gram positivas, que em sua maioria são produtoras de acetato (RUSSEL & STROBEL, 1989). Entretanto, a inclusão do bioproduto não favoreceu a produção de propionato.

Quando o ambiente ruminal favorece a produção de propionato, atribuí-se a uma fermentação energeticamente mais eficiente. Na formação de acetato ocorre liberação de CO₂ (dióxido de carbono) no meio, estando sujeito a formação de metano (CO₄), que representa perdas de energia para o animal, enquanto que na formação do propionato nenhum CO₂ é liberado (KOZLOSKI, 2011).

TABELA 9 – Média, efeitos de ordem linear (L) e quadrático das concentrações AGCC e relação C2/C3 com diferentes doses do extrato bruto de sucupira.

Variável	Tratamento				Efeito (P valor)	
	CON	0,06%	0,12%	0,24%	L	Q
C2, mMol/mL	46,61	40,51	36,21	29,03	0,001 ¹	0,454
C3, mMol/mL	21,95	19,19	20,04	18,31	0,238	0,728
C4, mMol/mL	13,35	14,06	12,78	10,48	0,185	0,573
C2/C3	2,16	2,12	1,81	1,55	<0,001 ²	0,950
Total, mMol/mL	91,07	83,20	77,97	66,92	0,011 ³	0,846

C2; C3; C4; C2:C3; Total AGCC. ¹ $y = -71.577x + 45.608$ ($R^2 = 0.4844$); ² $y = -2.7043x + 2.1975$ ($R^2 = 0.232$); ³ $y = -100.5x + 85.138$ ($R^2 = 0.334$).

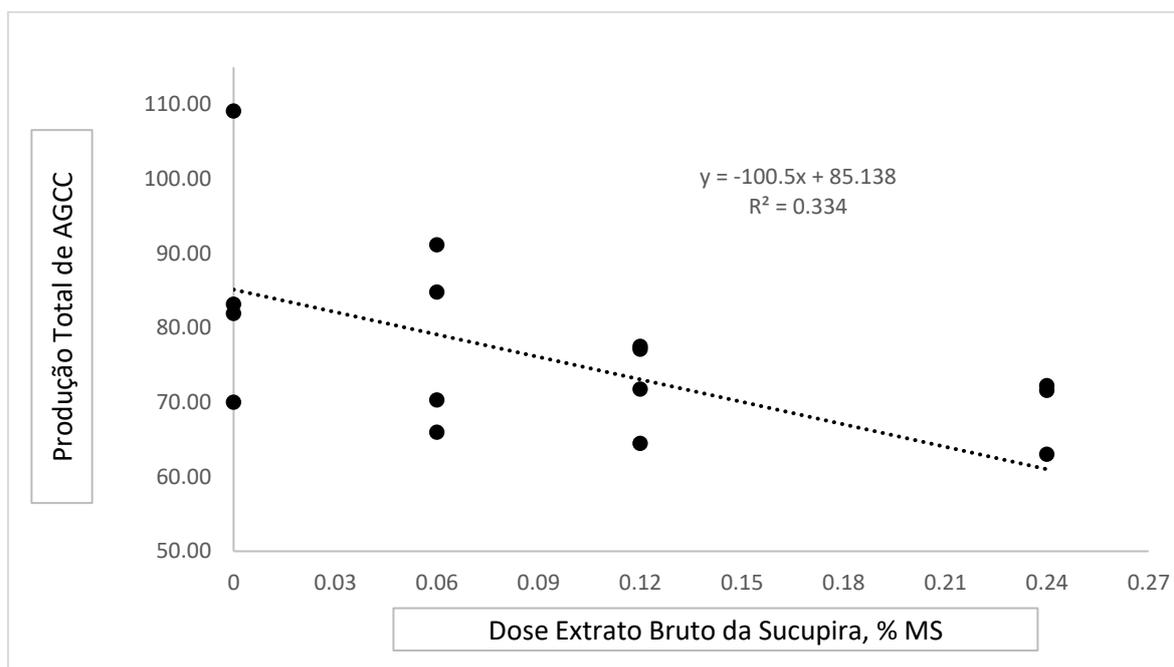


Figura 8. Regressão entre a produção total de AGCC e as doses do extrato bruto de Sucupira.

Souza (2013) que em estudo *in vitro* utilizando a incubadora TE-150 (TECNAL) testando diferentes doses do extrato bruto de Sucupira (0, 30, 300 e 3000 mg/L) tendo a dieta experimental uma relação volumoso:concentrado de 10:90, também encontrou diferenças na concentração total de AGCC e na concentração de acetato, onde observou que os tratamentos 0 e 3000 ppm se diferem dos tratamentos 30 e 300 ppm respectivamente (36,7; 26,5; 48,13; e 48,87 mMol/mL). A relação C2/C3 também foi afetado pelos tratamentos observando uma menor relação para o tratamento 3000ppm.

Segunda a autora apesar da observada influencia na concentração AGCC totais com as doses 30 e 300 ppm, pode-se supor que, nestas doses o óleo bruto de Sucupira apresentou baixa ou nenhuma seletividade sobre bactérias, vista a não redução da relação C2/C3. A redução da concentração de acetato indica que a adição 3.000 ppm de óleo bruto

de Sucupira teve supostamente atividade inibitória sobre bactérias gram positivas, que em sua maioria são produtoras de acetato e amônia (RUSSEL & STROBEL, 1989). Entretanto, a inclusão do bioproduto não favoreceu a produção de propionato.

Porém Lemos (2013) em estudo *in vitro* utilizando a incubadora TE-150 (TECNAL) testando diferentes doses do extrato bruto de Sucupira (0, 30, 300 e 3000 mg/L) tendo a dieta experimental uma relação volumoso:concentrado de 50:50, não encontrou diferenças nas concentrações dos AGCC e na proporção molar C2/C3.

A autora relata que a alta viscosidade do óleo extraído dos frutos da Sucupira pode ter dificultado sua interação com o meio de incubação, ou mesmo o processo de colonização do substrato pelos microorganismos, acarretando a ausência de efeitos sobre os produtos da fermentação da dieta.

A dificuldade de se trabalhar com o extrato bruto de Sucupira, no corrente estudo, foi resolvido com a produção do premix Sucupira, onde o extrato bruto da Sucupira foi homogeneizado com amido de mandioca e maltodextrina.

Busquet et al. (2005) trabalharam com fermentadores de fluxo contínuo duplo inoculado com líquido ruminal de bovinos alimentados com dieta 50:50 (feno de alfafa:concentrado) e estudaram os efeitos de cinnamaldehyde (CIN) e garlic oil, *Allium sativa*, (GAR) na fermentação ruminal. Os tratamentos eram controle, 1,25mg/L de monensina (MON), 12,5mg/L (MON10), 31,2mg/L CIN, 312mg/L (CIN10), 31,2mg/L GAR e 312mg/L (GAR10).

Os autores relatam que a concentração total de AGCC foi afetada ($P < 0,05$) pelo tratamento MON10, aumentando a concentração total de AGCC comparados com o controle (104,4 e 87,4mM). A concentração de acetato foi diminuída ($P < 0,05$) pelos tratamentos MON10, CIN, CIN10, e GAR10 comparados com o controle (45,9; 55,8; 57,0; 46,8 e 61,2%) e a proporção de propionato foi aumentada ($P < 0,05$) pelos tratamentos MON10, CIN e GAR10 comparados com o controle (45,1; 24,2; 27,4 e 20,5%) o que acarretou na menor relação C2:C3 ($P < 0,05$) para os tratamentos MON10, CIN, GAR10 comparados com o controle (1,0; 2,3; 1,7 e 3,0). Os resultados referentes com a concentração de acetato e relação C2:C3 corroboram que os apresentados com o uso do extrato de Sucupira o que indica uma ação de extratos vegetais sobre a fermentação de bactérias celulolíticas.

CASTILLEJOS et al. (2006) avaliaram as doses 5, 50, 500 e 5000 mg/L de óleo essencial contendo os compostos eugenol, guaiacol, limoneno, timol e vanilina, avaliados em meio de cultura *in vitro* por 24 h e utilizando como substrato ração com proporção

volumoso:concentrado 60:40. Os efeitos observados foram dependentes das doses utilizadas. A dose 5000 mg/L reduziu a concentração total de AGCC, consequentemente maior pH ruminal em comparação ao tratamento controle (sem aditivo). A dose de 500 mg/L de Timol reduziu a concentração total de AGV (-28,5%), a proporção de propionato (-18,4%), a concentração de N-NH₃ (-31,9%) e de ácidos graxos de cadeia ramificada (-41,7%), houve aumento na proporção de acetato (+1,8%), a relação acetato:propionato (+35,5%) e o pH ruminal (+6,3%). A redução na concentração de ácidos graxos de cadeia ramificada e N-NH₃ é consistente com a inibição do processo de deaminação.

Segundo Cardozo et al., (2005) o óleo de canela e seu principal componente, o cinamaldeído, aumentam a relação acetato/propionato em meio de incubação com pH 7,0 e em meio com pH 5,5 causa redução na relação acetato/propionato. Sendo que à influência do meio externo, pode-se modular o efeito dos óleos essenciais pelo pH do meio. Sendo assim, rações ricas em concentrado, mais propensas ao baixo pH ruminal, podem potencializar os efeitos desses produtos. O timol, por exemplo, foi mais efetivo em pH 5,5 do que 6,5 (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Utilizando plantas brasileiras e níveis de 4225, 850, e 1700 mg/L de fluido ruminal tamponado Araujo (2010), relatou que o óleo essencial destas plantas alterou a fermentação ruminal, diminuindo a relação C2/C3 e produção de metano em técnica *in vitro*.

Em trabalho realizado com ovelhas alimentadas com 100 e 150 mg/kg de concentrado de “Crina[®] Ruminants”, aumentou a produção de propionato e tendência em diminuir a concentração de acetato (GIANNENAS et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

Os resultados do estudo *in vitro* demonstram que a adição do extrato de *Pterodon emarginatus* Vogel (Sucupira) foi capaz de afetar a digestibilidade do ambiente ruminal, pois aumentou a digestibilidade da MS e MO comparados com a Monensina Sódica, sem efeitos na DFN e DFA e afetou o perfil dos AGCC com a diminuição da concentração do C2 para o tratamento 0,24% assim como a diminuição da relação C2/C3, sendo o efeito do extrato dose dependente.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato de *Pterodon emarginatus* Vogel (Sucupira) tem potencial de modular a fermentação ruminal devido o seu efeito nos microrganismos ruminais, podendo ser usado como aditivo para manipular a fermentação no rúmen e ser um provável substituto da monensina sódica, porém mais estudos devem ser realizados para elucidar e responder as dúvidas referentes a utilização destas substâncias, como esclarecer os efeitos desses produtos sobre os microrganismos ruminais, seus efeitos no metabolismo animal, nos parâmetros de fermentação ruminal *in vivo*, quantificar as doses a serem utilizadas *in vivo* e quantificar os ganhos em desempenho animal.

O teste de digestibilidade ruminal *in vitro* pelo Sistema de Cultura em Fluxo Contínuo mostrou ser uma importante metodologia alternativa e de precisão para o estudo de digestibilidade ruminal. Conseguiu-se proporcionar condições necessárias, como temperatura, pH, umidade e substrato, para a fermentação microbiana durante o tempo necessário à realização dos ensaios.

Foi atingido o objetivo de equipar o Laboratório de Nutrição Animal da EVZ-UFG com sistema capaz de simular a digestão microbiana ruminal e que sirva de suporte técnico-científico a Rede Multidisciplinar Pró-Cento-Oeste.

REFERÊNCIAS

1. AOAC, Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, 16th ed. (5th revision), AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 1990.
2. ARAUJO, R. C. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro. 2010. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
3. BERCHIELLI, T. T.; GARCIA, A. V. OLIVEIRA, S. G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V. OLIVEIRA, S. G. (Ed.). Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583 p.
4. BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; CARRO, M. D.; KAMEL, C. Effect of Garlic Oil and Four of its Compounds on Rumen Microbial Fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.88, n. 12, p.4393–4404, 2005.
5. CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2580–2595, 2007.
6. CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2004. 135p.
7. 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 Animal Science*, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.
8. CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S, FERRET, A. Effect of Essential Oil Active Compounds on Rumen Microbial Fermentation and Nutrient Flow in In Vitro Systems. **Journal Dairy Science**, Champaign, v.89, n. 7, p.2649–2658, 2006.
9. COELHO, M. C. F.; PINTO, J. E. B. P.; MORAIS, A. R.; CID, L. P. B.; LAMEIRA, O. A. Germinação de sementes de sucupira-branca *Pterodon pubescens* (BENTH.) in vitro e ex vitro. **Ciência Agrotecnológica**, Lavras, v.25, n.1, p. 38-48, 200.
10. DUTRA, R.C.; PITTELLA, F.; DITZ, D.; MARCON, R.; PIMENTA, D. S.; LOPES, M. T. P.; RAPOSO, N. R. B. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.22, n.5, p. 971-978, 2012.
11. FRASER, G. R.; CHAVES, A. V.; WANG, Y., MCALLISTER, T. A.; BEAUCHEMIN, K. A.; BENCHAAAR, C. Assessment of the Effects of Cinnamon Leaf Oil on Rumen

- Microbial Fermentation Using Two Continuous Culture Systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 5, 2007.
12. GIANNENAS I, SKOUFOS J, GIANNAKOPOULOS C, WIEMANN M, GORTZI O, LALAS S, KYRIAZAKIS I. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. **Journal Dairy Science**, Champaign. 94:5569-5577. 2011.
 13. HANNAH, S. M.; STERN M. D. and EHLE F. R. Evaluation of dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation in vivo of mixed diets containing various soybean products. **Animal Feed Science Technology**. 16:51–62. 1986.
 14. HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of ‘sucupira’ (*Pterodon* spp.). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 607-616, 2010.
 15. HOLDEN, L.A. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p. 1791-1794, 1999.
 16. HOOVER, W. H.; CROOKER, B. A.; SNIFFEN, C. J. Effects of differential solidliquid removal rates on protozoa numbers in continous cultures of rumen contents. *Journal of Animal Science*, Champaign, v.43, n. 2, p. 528-534, 1976.
 17. JOUANY, J. P. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. **Science Aliments**, v. 2, p.131–144, 1982.
 18. KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 216p.
 19. LEMOS, B. J. M.; **Fermentação ruminal *in vitro* com adição de extrato de plantas do cerrado**. 2013. 57 f. Dissertação. (Mestre em Ciência animal). Escola de Veterinária e Zootecnia. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.
 20. LÓPEZ, S. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 87-121.
 21. MERTENS, D. R. Rate and extent of digestion. In: DIJKSTRA, J.; FORBES, J. M.; FRANCE, J. (Ed.). **Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism**. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing, 2005. p. 13-48.
 22. 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**, Amsterdam, v. 123/124, n. 1, p. 31-50, 2005.
 23. NRC. 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cows**, 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

24. POLO, M.; CARVALHO, J. C. T.; MESQUISTA, J. M. O.; SARTI, S.J.; SANTOS FILHO, D.; SERTIÊ, J.A.A. Caracterização fitoquímica do extrato bruto hexânico e do óleo essencial dos frutos da espécie *Pterodon emarginatus* Vog. **Revista da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas**, v. 26, p.45-49, 2004.
25. R, The R Development Core Team. R: A Language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 1706p, 2012.
26. RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J. Minireview. Effect of ionophore on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1-6, 1989.
27. SILVA, I. D.; TAKATSUKA, F. S.; ROCHA, M. R.; CUNHA, M. G. Efeito do extrato de sucupira (*pterodon emarginatus* vog.) sobre o desenvolvimento de fungos e bactérias fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.35, n.2, p.109-115, 2005.
28. SLIWINSKI, B.J.; SOLIVA, C. R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.101, p.101–114, 2002.
29. SOUZA, F. M.; **Fermentação microbiana ruminal *in vitro* com utilização de extratos de plantas do cerrado**. 2013. Dissertação de Mestrado. Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
30. SOUZA, C. E.; **Utilização de compostos secundários de plantas para mitigação de metano em ruminantes**. 2014. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
31. STERN, M. D.; ENDRES, M.I. **Laboratory Manual: Research Techniques in Ruminant Nutrition**. Department of Animal Science. University of Minnesota. 1991.
32. TEKIPPE, J. A., R. TACOMA, A. N. HRISTOV, C. Lee, J. OH, K. S. HEYLER, T. W. CASSIDY, G. A. VARGA, and BRAVO, D. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 96:7892–7903.
33. WELLER, R.A. and PILGRIM, A.F. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous *in vitro* fermentation system. **British Journal of Nutrition** 32: 341–351. 1974.