

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

**FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO* COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DE
PLANTAS DO CERRADO**

Barbara Juliana Martins Lemos
Orientador: Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes

GOIÂNIA
2013



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TE-DE) na Biblioteca Digital da UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás–UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTE/UFG, 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. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor: **Barbara Juliana Martins Lemos** E-mail: **barbara.lemos@zootecnista.com.br**

Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? ☐ Sim ☒ Não

Vínculo Empregatício do autor: Agência de fomento:

País: **Brasil** UF: **Goiás** CNPJ: Sigla:

Título: **FERMENTAÇÃO RUMINAL IN VITRO COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DE PLANTAS DO CERRADO** Palavras-chave: **aditivos antimicrobianos, Barbatimão, produtos fitogênicos, Copaíba, Pacari, Sucupira**

Título em outra língua: **In vitro ruminal fermentation with addition of extracts from Cerrado plants**

Palavras-chave em outra língua: **antimicrobial additives, Barbatimão, Copaiba, Pacari, phytogetic products, Sucupira**

Área de concentração: **Produção Animal** Data defesa: (dd/mm/aaaa) **01/03/2013**

Programa de Pós-Graduação: **Ciência Animal**

Orientador(a): **Juliano José de Resende Fernandes** E-mail: **juliano@vet.ufg.br**

Co-orientador(1): **Emmanuel Arnhold** E-mail: **emmanuelarnhold@yahoo.com.br**

Co-orientador(2): **Edemilson Cardoso da Conceição** E-mail: **farmacotecnicaufg@yahoo.com.br**

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

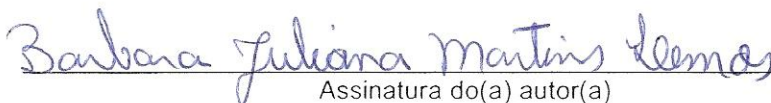
[] Capítulos. Especifique:

[] Outras restrições:

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

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Goiânia 22 de abril de 2013


Assinatura do(a) autor(a)

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

BARBARA JULIANA MARTINS LEMOS

**FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO* COM ADIÇÃO DE EXTRATOS DE
PLANTAS DO CERRADO**

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre 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 - UFG

Comitê de orientação:
Prof. Dr. Emmanuel Arnhold - UFG
Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição - UFG

GOIÂNIA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

Lemos, Barbara Juliana Martins.

L557f Fermentação ruminal *in vitro* com adição de extratos de plantas do Cerrado [manuscrito] / Barbara Juliana Martins Lemos. – 2013.

xv, 57 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes;
Coorientadores: Prof. Dr. Emmanuel
Arnhold; Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2013.

Bibliografia.


Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas. Apêndices.

1. Fermentação ruminal – Adição de extratos. 2. Aditivos antimicrobianos. 3. Produtos fitogênicos. I. Título.

CDU: 591.133.2(213.54)

BARBARA JULIANA MARTINS LEMOS

Dissertação defendida e aprovada em 01 de março de 2013, pela seguinte Banca Examinadora:


Prof. Dr. Juliano José de Resende Fernandes
(ORIENTADOR (A))


Prof. Dr. Rafael Canonenco de Araújo – Iniciativa Privada


Prof. Dr. Reinaldo Cunha de Oliveira Júnior - UEGGO

Ao Sagrado Coração de Jesus, ao Imaculado Coração de Maria
e à minha família,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho, em especial:

À Universidade Federal de Goiás, particularmente à Escola de Veterinária e Zootecnia, pela possibilidade de estudar e conduzir meus trabalhos em um ambiente agradável e muito construtivo.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, com admiração especial aos professores Milton Luiz Moreira Lima, Eliane Sayuri Miyagi e Heloisa Helena de Carvalho Mello por compartilharem seu vasto conhecimento sem restrições.

Ao professor Dr. Juliano José de Resende Fernandes, meu orientador, pela oportunidade, pelo ânimo, pela confiança e pelo direcionamento.

Aos professores Dr. Emmanuel Arnhold e Dr. Edemilson Cardoso da Conceição, meus co-orientadores, por fomentar meu interesse pela pesquisa e pelo apoio fundamental na execução deste trabalho.

Ao professor Reginaldo Nassar, a Cristine Cysneiros, Fabíola Alves Lino e ao Marcos Biehl pela colaboração nas análises laboratoriais.

Ao Victor Rezende Moreira Couto pela contribuição intelectual.

Aos estagiários Marcos da Silva Lima, Marcelo da Silva Lima, Marcelo Henrique dos Santos, Jéssika Carneiro Pimenta, Pâmella Alves Correia, Antônio Rafael Guimarães e demais, pelo esforço sem medidas.

A todos os colegas acadêmicos pelo companheirismo e colaboração, sintam-se agradecidos na pessoa de Flávia Martins de Souza.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada na avaliação dessa dissertação.

À minha família e amigos, especialmente minha mamãe Janeir Martins Carvalho, pela motivação, carinho e afeto.

Muito obrigada!

“Cada qual use o DOM recebido a serviço dos outros, como bons administradores
da multiforme Graça de DEUS.”

(I Pd, 4:10)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Aditivos Fitogênicos e a Fermentação Microbiana Ruminal	2
2.1.1 Saponinas	3
2.1.2 Taninos.....	4
2.1.3 Óleos essenciais	8
2.2 Aditivos Extraídos de Plantas do Cerrado	10
2.2.1 Extrato de Pacari	11
2.2.2 Extrato de Barbatimão	11
2.2.3 Óleo-resina de Copaíba.....	12
2.2.4 Óleo de Sucupira.....	13
2.3 Fermentação Ruminal <i>In Vitro</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Local e Período Experimental	16
3.2 Tratamentos e Delineamento Experimental	16
3.3 Dieta Experimental e Preparo do Substrato	17
3.4 Coleta e Preparo do Fluido Ruminal.....	17
3.5 Condições da Incubação <i>In Vitro</i>	18
3.6 Degradabilidade <i>In Vitro</i>	19
3.7 Digestibilidade Verdadeira.....	20
3.8 Análises Laboratoriais	20
3.9 Análise Estatística	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Extrato de Pacari	22
4.2 Extrato de Barbatimão	27
4.3 Óleo-resina de Copaíba.....	31
4.4 Óleo de Sucupira.....	36
5 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	ácidos graxos de cadeia curta
C ₂	ácido acético
C ₃	ácido propiônico
C ₄	ácido butírico
CH ₄	Metano
CO ₂	gás carbônico
DIVMS	digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
EE	extrato etéreo
EPM	erro padrão da média
FDA	fibra em detergente ácido
FDN	fibra em detergente neutro
MM	matéria mineral
MS	matéria seca
N	Nitrogênio
N-NH ₃	nitrogênio amoniacal
PB	proteína bruta
pH	potencial hidrogeniônico
TNT	tecido não tecido
V:C	volumoso : concentrado

RESUMO

Metabólitos secundários de plantas podem alterar o crescimento e metabolismo dos microrganismos ruminais. Sistemas *in vitro* tem sido muito utilizados nas pesquisas iniciais com aditivos fitogênicos. Objetivou-se avaliar a fermentação microbiana ruminal *in vitro* com adição de produtos extraídos de plantas do Cerrado. Foram conduzidos quatro ensaios independentes em fermentador TE-150, para avaliação de quatro doses (0, 30, 300 e 3.000 mg/L) de aditivos extraídos de Pacari, Barbatimão, Copaíba e Sucupira. A dieta (50:50, V:C) foi incubada durante 3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, cada uma das quatro incubações foi considerada um bloco. No ensaio com extrato seco obtido da casca do caule de Pacari (27,5% de taninos totais, principalmente taninos hidrolisáveis) a adição de 3.000 mg/L demonstrou potencial antimicrobiano, evidenciado por reduções ($P < 0,05$) na degradação ruminal da dieta, na DIVMS e das concentrações de N-NH₃ e AGCC. No segundo ensaio o extrato seco de Barbatimão (52,2% de taninos totais, rico em taninos condensados) apresentou um acentuado efeito antimicrobiano. A dose 3.000 mg/L deste aditivo reduziu ($P < 0,05$) a degradabilidade ruminal da dieta, a DIVMS e as concentrações de N-NH₃ e AGCC. No terceiro ensaio foi observada atividade antimicrobiana no ambiente ruminal para a óleoresina extraída do tronco da Copaíba (21,31% de β -cariofileno, óleo essencial). Houve reduções ($P < 0,05$) da fração “b” (potencialmente degradável), degradabilidade potencial e da DIVMS da dieta com a inclusão de 3.000 mg/L. As concentrações de N-NH₃ foram similares entre as doses 0 e 30 mg/L (126,5 e 120,2 mg/dL), e também entre as doses 300 e 3.000 mg/L (98,2 e 105,8 mg/dL). As concentrações de AGCC e o pH final do inóculo ruminal não diferiram ($P > 0,05$). O quarto ensaio trata da avaliação do óleo bruto extraído dos frutos de Sucupira (5,3% de β -cariofileno, óleo essencial). Para a fração “b” a dose 3.000 mg/L apresentou o menor valor de degradação, seguido da dose 300 mg/L, as doses 0 e 30 mg/L foram similares ($P > 0,05$). A degradabilidade potencial foi similar entre as doses 0 e 30 mg/L, e entre as doses 300 e 3.000 mg/L. A DIVMS da dieta foi 24% menor para a dose 3.000 mg/L em relação a 0 mg/L e foi similar entre as doses 0, 30 e 300 mg/L. As concentrações de N-NH₃ e AGCC não foram diferentes ($P > 0,05$) e o pH final da dose 3.000 mg/L ($P < 0,05$) foi mais elevado que os demais. Os aditivos extraídos de Pacari, Barbatimão, Copaíba e Sucupira apresentaram efeito antimicrobiano, sendo potencialmente úteis para manipular a fermentação microbiana ruminal. Investigações de doses entre 300 e 3.000 mg/L devem ser realizadas em estudos futuros.

Palavras chave: aditivos antimicrobianos, Barbatimão, produtos fitogênicos, Copaíba, Pacari, Sucupira

ABSTRACT

Plant secondary metabolites may alter the growth and metabolism of rumen microorganisms. *In vitro* systems have been widely used in early research with phytogetic additives. The objective was to evaluate *in vitro* rumen fermentation with addition of products extracted from Cerrado plants. Four independent trials were carried on TE-150 incubator, to evaluate four additives doses (0, 30, 300 e 3,000 mg/L) extracted from Pacari, Barbatimão, Copaíba e Sucupira. The diet (50:50 concentrate:forage) was incubated during 3, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours. The experimental design used was randomized block, each one of the four incubations was considered a block. In the first trial, the addition of 3,000 mg/L of dry extract obtained from the stem bark of Pacari (27,5% of total tannins, mainly hydrolysable tannins) demonstrated antimicrobial potential, evidenced by reductions ($P < 0.05$) in diet ruminal degradability, IVDMD, $\text{NH}_3\text{-N}$ and SCFA concentrations. In the second trial, the dry extract from Barbatimão (52.2% of total tannins, rich in condensed tannins) showed a marked antimicrobial effect. The dose 3,000 mg/L of this additive reduced ($P < 0.05$) diet ruminal degradability, IVDMD, $\text{NH}_3\text{-N}$ and SCFA concentrations. In the third trial the oleoresin extracted from the Copaiba tree trunk (21.31% of β -caryophyllene, essential oil) shows antimicrobial activity in the rumen environment. There were decreases ($P < 0.05$) in the fraction "b" (potentially degradable), potential degradability and diet IVDMD with inclusion of 3,000 mg/L. The concentrations of $\text{NH}_3\text{-N}$ were similar between doses 0 and 30 mg/L (126.5 and 120.2 mg/dL), and also between 300 and 3,000 mg/L doses (98.2 and 105.8 mg/dL). The SCFA concentrations and the ruminal pH were not different ($P > 0.05$). The fourth trial evaluates the oil extracted from the fruits of Sucupira (5.3% of β -caryophyllene, essential oil). For fraction "b" (potentially degradable) the 3,000 mg/L dose had the lowest degradation result (32.14%), followed by the 300 mg/L dose (47.51%), 0 and 30 mg/L doses were similar ($P > 0.05$). The potential degradability was similar between 0 and 30 mg/L, and also between 300 and 3,000 mg/L. With addition of 3,000 mg/L the IVDMD of diet was 24% lower than 0 mg/L and was similar between 0, 30 and 300 mg/L. The $\text{NH}_3\text{-N}$ and SCFA concentrations were not different ($P > 0.05$), and the ruminal pH of the dose 3,000 mg/L ($P < 0.05$) was higher than the others. The additives extracted from Pacari, Barbatimão, Copaiba and Sucupira showed antimicrobial properties in the rumen environment, being potentially useful to modify the microbial fermentation. Investigations of doses between 300 and 3,000 mg/L should be conducted in future studies.

Keywords: antimicrobial additives, Barbatimão, Copaiba, Pacari, phytogetic products, Sucupira

1 INTRODUÇÃO

Aditivos antimicrobianos reduzem perdas de energia e proteína no rúmen, melhorando o desempenho animal e mitigando os impactos resultantes da excreção de amônia e metano no ambiente. Entretanto, preocupações do mercado mundial com a segurança alimentar tendem a restringir seu uso na alimentação animal. Em 2006, devido ao risco da possível presença de resíduos antibióticos nos produtos de origem animal, a União Europeia proibiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento, alegando a possibilidade de selecionar microrganismos resistentes aos antibióticos usados na medicina humana (OJEU, 2003).

Desta forma, cresce o interesse científico para identificar substâncias fitogênicas com ação similar aos aditivos antimicrobianos atualmente usados. Os vegetais superiores produzem em seu metabolismo secundário compostos utilizados como defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (KAMRA et al., 2006). Estes compostos podem alterar o crescimento e metabolismo de bactérias, fungos e protozoários. Na nutrição de ruminantes se estudada principalmente as atividades de saponinas, taninos e óleos essenciais.

Sistemas *in vitro* são amplamente utilizados nas fases iniciais de pesquisas que objetivam identificar substâncias fitogênicas capazes de manipular a fermentação ruminal (ARAUJO 2010; SOLIVA et al., 2011; CASTRO-MONTOYA et al. 2012). Nestes sistemas, a degradação da dieta e os produtos acumulados constituem um indicativo da atividade fermentativa dos microrganismos.

Neste estudo foram selecionados produtos de plantas do Cerrado com propriedades antimicrobianas comprovadas: extratos secos obtidos das cascas do caule de Pacari (*Lafoensia pacari*) (PORFÍRIO et al., 2009) e Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (GONÇALVES et al., 2005), óleoresina do caule da Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) (PIERI et al., 2012) e óleo dos frutos de Sucupira (*Pterodon emarginatus*) (TOLEDO et al., 2011).

Objetivou-se avaliar a fermentação microbiana ruminal *in vitro* com adição desses produtos fitogênicos, a fim de serem posteriormente estudados em ensaios com fermentador de fluxo contínuo e *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aditivos Fitogênicos e a Fermentação Microbiana Ruminal

O uso de aditivos fitogênicos na nutrição de ruminantes fundamenta-se em propriedades antioxidante, antiinflamatória, imunoestimulante e antimicrobiana podendo alterar favoravelmente a fermentação ruminal, melhorando o aproveitamento dos nutrientes (YANG et al., 2007; SOLIVA et al., 2011).

Os critérios para identificar compostos com efeitos positivos na fermentação ruminal envolvem o aumento ou nenhuma mudança na produção total de AGCC, associado a mudanças nas proporções molares dos mesmos e também à redução ou nenhuma mudança na concentração de N-NH₃ no ambiente ruminal. Em dietas com alta densidade energética a concentração de N pode ser limitante para a síntese proteica microbiana. Bactérias que degradam carboidratos fibrosos utilizam prioritariamente amônia como fonte de N para sintetizar sua proteínas, enquanto bactérias que fermentam carboidratos não fibrosos usam amônia, aminoácidos e peptídeos (KOZLOSKI, 2011).

No rúmen, a maior parte das bactérias que produzem amônia, lactato, C₂, C₄, CO₂ e CH₄ são gram positivas. Bactérias gram negativas, geralmente produzem C₃ e consomem lactato. Fungos auxiliam na degradação da fibra do alimento. Protozoários, apesar de engolfarem bactérias, evitam a rápida queda do pH em dietas com alto teor de amido. Desta forma, os aditivos fitogênicos podem agir de forma seletiva sobre populações de microrganismos, alterando a produção e as proporções dos produtos da fermentação dos nutrientes dietéticos.

Muitos estudos dedicam-se ao uso de extratos de plantas como aditivos para ruminantes, sendo investigada especialmente a atividade antimicrobiana das saponinas, taninos e óleos essenciais (CASTILLEJOS et al., 2006; GOEL et al., 2008; BHATTA et al., 2009; ARAUJO, 2010; KOZLOSKI et al., 2012).

A meta análise realizada por KLEVENHUSEN et al. (2012) indicou que as doses de compostos bioativos e a composição química da dieta incubada são fatores determinantes das respostas na fermentação ruminal nos diferentes sistemas *in vitro*.

2.1.1 Saponinas

Saponinas são compostos de alto peso molecular nos quais açúcares (glucose, galactose, ácido glucurônico, arabinose, xilose ou raminose) estão ligados de forma covalente a uma aglicona hidrofóbica triterpenóide ou esteróide (sapogenina). Essa estrutura, com uma parte lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de interagir com esteróides da membrana, acumulando-se ou formando poros e vesículas na membrana celular dos microrganismos (AUGUSTIN et al., 2011), desestruturando a mesma.

Saponinas atuam mais acentuadamente sobre protozoários e fungos ruminais, formando complexos irreversíveis com o colesterol presente na membrana celular destes microrganismos. Apesar de procariontes não possuírem esteróides em suas membranas (FRANCIS et al., 2002), as saponinas podem inibir o desenvolvimento de bactérias gram positivas (PATRA & SAXENA, 2010).

Protozoários ruminais são predadores de bactérias e produtores de amônia. Diminuindo sua população ocorre menor produção de amônia e aumento no aporte de proteína metabolizável, devido ao aumento do escape de bactérias para o intestino delgado. No entanto, em ruminantes recebendo dietas com alta inclusão de grãos, a eliminação dos protozoários pode reduzir a capacidade de absorção dos nutrientes, pois estes ingerem grande quantidade de amido evitando a rápida queda do pH ruminal.

No estudo de GOEL et al. (2008), a adição *in vitro* de saponinas (*Carduus*, *Sesbania*, folhas de *Knautia* e sementes de fenugreek) em dieta 50:50 (V:C) não afetou a produção de metano e AGCC. No entanto, houve redução da população de protozoários e fungos, ocasionando aumento de bactérias fibrolíticas (*Fibrobacter succinogenes* - gram negativa e *Ruminococcus flavefaciens* - gram positiva).

BUSQUET et al. (2006) observaram que, mesmo em altas doses (3.000 mg/L), extratos contendo saponinas (fenugreek - 18%, yucca - 8%) não afetaram a produção *in vitro* de AGCC e as proporções de C₂, C₃ e C₄. A concentração de amônia diminuiu nas doses 300 e 3.000 mg/L do extrato de fenugreek e não foi alterada pelas doses de extrato de yucca.

LILA et al. (2003) observaram que a adição *in vitro* de diferentes concentrações da saponina esteroideal extraída de *Yucca schidigera* (1,2; 1,8; 2,4 e 3,2 g/L) diminuiu ligeiramente o pH do meio. De maneira dose-dependente, reduziu as concentrações de N-NH₃ e a contagem de protozoários. A produção total de AGCC e gases aumentou, enquanto que a proporção molar de C₂ foi reduzida.

Um aspecto importante sobre a atividade antiprotozoária das saponinas é que a mesma tem sido descrita como transitória. CHEEKE (2000) relata que isto acontece porque esta ação requer as cadeias núcleo e laterais da estrutura da saponina presentes e intactas. No entanto, as saponinas são hidrolisadas por bactérias ruminais que removem o carboidrato das cadeias laterais.

Uma estratégia para manutenção da atividade antiprotozoária seria o fornecimento de saponinas em intervalos programados. Em estudo *in vitro* utilizando fermentador de fluxo contínuo, CARDOZO et al. (2004) verificaram a adaptação da microbiota ruminal em seis dias à adição 7,5 mg/Kg de MS de extrato de yucca (8% de saponinas).

Outra consideração importante se refere ao estudo de CARDOZO et al. (2005) em que o efeito de saponinas (yucca – 8% de saponinas) sobre a fermentação microbiana ruminal comportou-se como altamente dependente do pH, assim como outros metabólitos secundários de plantas. Em pH 5,5, característico de dietas com alta inclusão de concentrado, a fermentação foi alterada favorecendo a produção de C₃, sendo energeticamente mais eficiente.

2.1.2 Taninos

Taninos são polímeros fenólicos presentes nas plantas. Taninos condensados e taninos hidrolizáveis são as principais classes de taninos. Taninos condensados compreendem polímeros de flavonóides (catequina e galocatequina) cujas formas monoméricas são antocianidinas (cianidina e delfinidina). Taninos hidrolizáveis compreendem polímeros de ácido gálico ou elágico esterificados a uma molécula central, geralmente açúcar ou um polifenol (Figura 01) (PATRA & SAXENA, 2010).

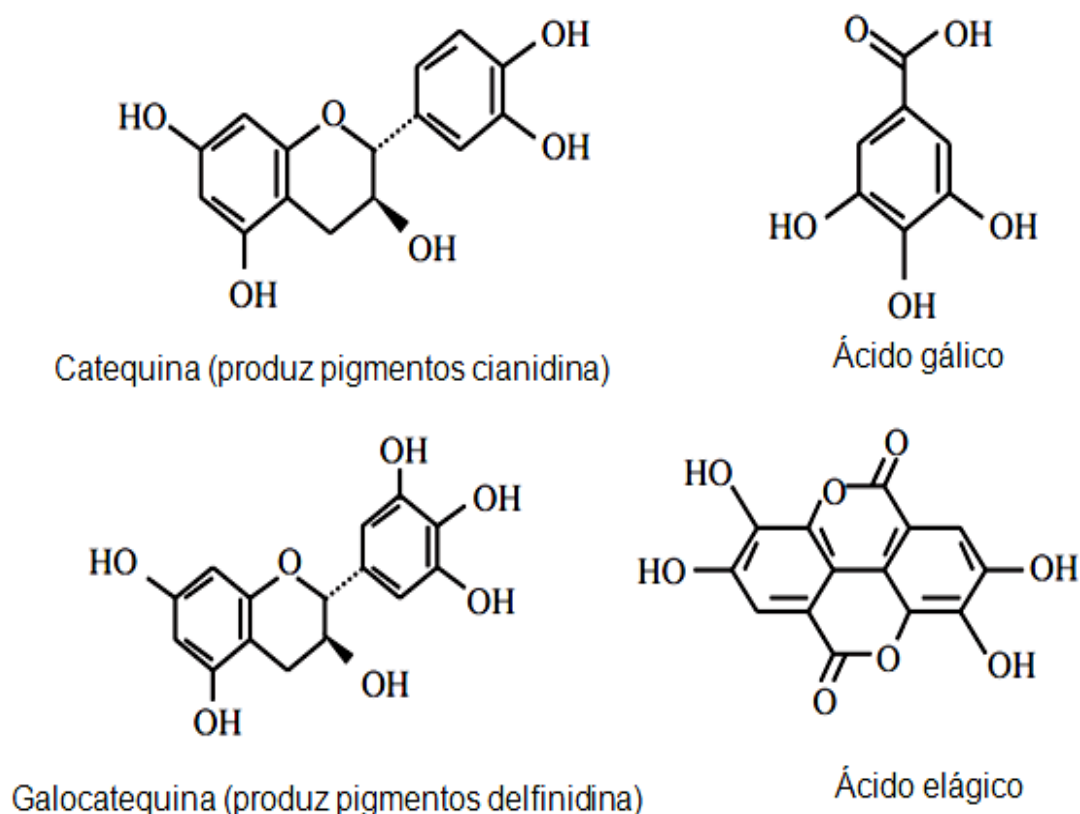


FIGURA 1. Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina – cianidinas e galocatequina - delphinidinas) e de taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico).

Fonte: Adaptado de PATRA & SAXENA (2010).

A atividade antimicrobiana dos taninos está relacionada com seus compostos polifenólicos que contêm grupos hidroxila em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações estáveis. Agem por diferentes mecanismos, podendo inibir enzimas microbianas extracelulares como pectinases, celulasas e peroxidases, reduzindo sua atividade fermentativa (McSWEENEY et al., 2001).

Os taninos também podem privar substratos requeridos para o crescimento microbiano pela complexação com macromoléculas, principalmente proteínas, polissacarídeos e íons metálicos (McSWEENEY et al., 2001). Possuem a capacidade de reagir com a parede celular bacteriana ou ainda de agir diretamente sobre o metabolismo microbiano. SCALBERT (1991) relata estudos em que o ácido tânico (tanino hidrolisável) foi capaz de inibir a fosforilação

oxidativa, o transporte de elétrons na cadeia transportadora e de afetar a integridade da membrana celular.

Outro aspecto interessante segundo SCALBERT (1991) se refere à habilidade que muitos microrganismos adquiriram evolutivamente de superar as defesas de plantas baseadas em taninos. Podendo desintoxicar taninos através de síntese de polímeros de tanino-complexantes, oxidação, biodegradação do tanino ou síntese de tanases, como fazem os fungos *Aspergillus niger* e *Pencillium ylaucum*.

Taninos hidrolisáveis são rapidamente degradados em grupos fenólicos menores (HAGERMAN et al., 1992) de baixo peso molecular que se intercalam entre os espaços interfibrilares das proteínas ou macromoléculas, mas não forma ligações suficientes para assegurar a estabilidade do complexo (MONTEIRO et al., 2005). Desta forma, podem ser metabolizados por microorganismos ou sofrer digestão gástrica. REED (1995) afirma que taninos hidrolisáveis são potencialmente tóxicos para ruminantes, sendo o pirogalol, hepatotóxica e nefrotóxica, produto da degradação de taninos hidrolisáveis por microrganismos no rúmen. Taninos condensados não são considerados tóxicos, porque não são absorvidos, mas podem estar associados a lesões na mucosa intestinal.

Por serem fenóis, taninos condensados são quimicamente muito reativos e possuem a capacidade de formar complexos reversíveis e irreversíveis com proteínas, polissacarídeos (celulose, pectina, hemicelulose), alcalóides, ácidos nucleicos e minerais (FRUTOS et al., 2004). MONTEIRO et al. (2005) relatam que um mol de tanino pode se complexar a doze moles de proteínas.

McSWEENEY et al. (2001) revelam que ainda não foram identificados microrganismos anaeróbios capazes de degradar os complexos de taninos condensados com proteínas. Desta forma, os complexos podem não ser desfeitos e passar intactos pelo trato digestivo, sendo excretados nas fezes.

Entretanto, FRUTOS et al. (2004), explicando a atividade de taninos no trato digestivo, relatam que o principal efeito sobre as proteínas baseia-se na capacidade de formar ligações de hidrogênio, que são estáveis em pH entre 3,5 e 8,0. Estes complexos se dissociam quando o pH cai abaixo de 3,5 (como no abomaso, pH 2,5-3,0), ou eleva-se superior a 8,0 (no duodeno, pH 8,0). No

entanto, a estabilidade do complexo depende também da afinidade entre o tanino e a macromolécula, determinando a reversibilidade do processo no intestino.

Geralmente, os complexos formados entre taninos e proteínas ou outros compostos são instáveis. As interações entre proteínas e taninos envolvem interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, e ligações covalentes (irreversíveis), através da oxidação dos polifenóis em quinonas e a sua condensação subsequente com grupos nucleofílicos da proteína (FRUTOS et al., 2004).

O núcleo polifenólico dos taninos tem em sua estrutura molecular zonas apolares, como o anel benzênico, que podem interagir com zonas apolares das proteínas, tais como as cadeias laterais de aminoácidos como a alanina, leucina, isoleucina e prolina; e também apresenta zonas hidrofílicas, como os grupos hidroxila, que podem formar pontes de hidrogênio com os grupos carbonila e amino da proteína (FRUTOS et al., 2004).

No estudo de MEZZOMO et al. (2011), o uso de taninos condensados (0,4% da MS) como aditivo em dieta de bovinos com alto nível de concentrado (87% da MS) e farelo de soja como fonte de proteína verdadeira apresentou efeitos positivos sobre a utilização da proteína bruta. A digestibilidade ruminal e a taxa de digestão da proteína foram reduzidas e, conseqüentemente, os níveis de proteína metabolizável aumentaram, sem alterar os parâmetros da fermentação ruminal.

A capacidade de formar complexos com macromoléculas representa o efeito mais estudado dos taninos na nutrição de ruminantes. No entanto, estes compostos também podem inibir diretamente os microrganismos. BHATTA et al. (2009), avaliando efeitos de taninos hidrolisáveis isolados ou em associação com taninos condensados, observaram que ambos reduziram a produção de CH₄. Entretanto, os taninos hidrolisáveis apresentaram menor atividade que a associação com taninos condensados (0,6 vs 5,5%). As fontes contendo taninos hidrolisáveis associados a condensados foram mais potentes na supressão da metanogênese do que apenas taninos hidrolisáveis. Os resultados sugerem que os taninos condensados possuem maior potencial antimicrobiano.

O'DONOVAN & BROOKER (2001) demonstraram a atividade antimicrobiana de taninos hidrolisáveis e condensados sobre o crescimento, morfologia e metabolismo de *Streptococcus gallolyticus* (antes chamado *S. caprinus*) e *Streptococcus bovis*. Nas condições *in vitro*, o *S. gallolyticus* foi resistente a quantidades 10 vezes maiores do que as toleradas pelo *S. bovis*. Resultado este que indica que bactérias do mesmo gênero podem apresentar diferentes graus de tolerância à presença dos taninos, em virtude do desenvolvimento de mecanismos que reduzem o efeito potencial de taninos sobre o crescimento celular. Estes mecanismos conferem vantagem seletiva aos microrganismos.

2.1.3 Óleos essenciais

Ao contrário do que o nome sugere, óleos essenciais não são lipídios. São substâncias lipofílicas, líquidas, aromáticas e voláteis. Seus compostos ativos mais importantes estão incluídos em dois grupos químicos: terpenóides (monoterpenos C_{10} , sesquiterpenos C_{15} e diterpenos C_{20}) e fenilpropanóides (DORMAN & DEANS, 2000).

Uma vez que são constituídos de misturas de componentes, provavelmente a atividade antibacteriana de óleos essenciais envolve vários mecanismos de ação que ainda não são bem compreendidos. Além da permeabilidade da membrana, os óleos essenciais também podem atuar no citoplasma ou organelas das células microbianas (CASTILLEJOS et al., 2006). Também podem inibir a síntese de RNA, DNA e proteínas da célula. Além disso, possuem a capacidade de interagir com grupos sulfídricos de outros componentes ativos (CALSAMIGLIA et al. 2007).

Acredita-se que a maior parte dos óleos essenciais exerça ação antimicrobiana devido ao seu caráter lipofílico (BENCHAAAR et al., 2008a). Seus componentes fenólicos interagem com a membrana celular bacteriana, alterando o transporte de elétrons, o gradiente de íons, a translocação de proteínas, fosforilação e outras reações dependentes de enzimas (DORMAN & DEANS, 2000). Isto retarda o crescimento microbiano e pode causar a morte das células, resultando em mudanças na proporção das populações no rúmen.

Alguns óleos essenciais estudados no ambiente ruminal, como o carvacrol, presente no orégano, são capazes de formar canais na membrana celular dissolvendo a dupla camada fosfolipídica e alinhando-se entre os ácidos graxos. Isto causa a expansão e desestabilização, aumentando a fluidez e a permeabilidade passiva da membrana celular (ULTEE et al., 2002).

Neste sentido, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é mais acentuada contra bactérias gram positivas. Este fato tem sido relacionado com a presença da membrana externa nas bactérias gram negativas conferindo uma superfície hidrofílica que atua como uma barreira (BUSQUET et al., 2006).

No entanto, substâncias de baixo peso molecular presentes em alguns óleos essenciais, como hidrocarbonetos alifáticos, ácidos, álcoois, aldeídos e ésteres acíclicos, fazem com que também atuem sobre bactérias gram negativas. Por difusão, essas substâncias transpõem a parede externa através das proteínas da membrana ou lipopolissacarídeos, chegando à parede celular interna da bactéria. Essa propriedade aumenta a dificuldade na manipulação da fermentação ruminal, uma vez que reduz a seletividade dos óleos essenciais (CALSAMIGLIA et al., 2007).

Entretanto, isto pode ser interessante se adequadamente identificadas as populações susceptíveis e suas interações com microrganismos de interesse. KOZLOSKI (2011) relata que o rúmen é ambiente dinâmico e altamente complexo, bem como a maior parte das espécies bacterianas ainda não foram identificadas e pouco se sabe sobre as interações metabólicas entre elas.

CARDOZO et al. (2005) mostraram que a atividade antimicrobiana de vários óleos essenciais comporta-se como pH dependente, tendo sua atividade potencializada em pH baixo, próximo de 5,5. Isto acontece devido ao estado dissociado (hidrofílico) ou indissociado (mais hidrofóbico) das moléculas ativas. À medida que o pH diminui, as moléculas tendem a se tornar não dissociadas, tornando-se mais hidrofílicas, interagindo mais facilmente com as membranas celulares e exercendo o seu efeito antimicrobiano.

Neste sentido, os resultados mais promissores do trabalho de ARAUJO (2010) foram observados ao se incubar dieta de alta inclusão de concentrado com inóculo adaptado à esta dieta, que normalmente apresenta valores de pH baixos.

Sob esta condição, os óleos essenciais extraídos de plantas brasileiras aumentaram a concentração de propionato, reduziram a relação $C_2:C_3$ e/ou diminuíram a produção de CH_4 .

No trabalho de CARDOZO et al. (2005) em pH 5,5, que geralmente ocorre em animais recebendo alta inclusão de concentrado, o cinamaldeído (óleo essencial da canela) aumentou a concentração total de AGCC e diminuiu a relação $C_2:C_3$. Entretanto, em pH 7,0 que pode ser relatado para animais alimentados exclusivamente com volumosos, este óleo essencial exerceu o efeito oposto, diminuindo a concentração total de AGCC e aumentando a relação $C_2:C_3$.

Quanto às dosagens utilizadas, CALSAMIGLIA et al. (2007) verificaram que na maioria dos ensaios *in vitro* quando a concentração do componente ativo foi superior a 500 mg/L, os efeitos eram prejudiciais. Dependendo do composto ativo, em doses moderadas entre 50 e 500 mg/L alguns óleos essenciais foram capazes de modificar a fermentação ruminal alterando a produção de AGCC, o metabolismo protéico ou ambos.

2.2 Aditivos Extraídos de Plantas do Cerrado

O Bioma Cerrado possui extensão aproximada de dois milhões de quilômetros quadrados, ocupando cerca de 23% do território brasileiro (IBGE, 2004). Nele encontram-se muitas espécies de plantas com propriedades antimicrobianas descritas, sendo potencialmente úteis e viáveis para manipular a fermentação ruminal.

ARAUJO (2010) observou que as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais extraídos de plantas brasileiras foram capazes de alterar favoravelmente a fermentação ruminal. Utilizando a técnica *in vitro* de produção de gases, o autor constatou o aumento da concentração de C_3 , associado à redução da relação $C_2:C_3$ e diminuição da produção de CH_4 . Os resultados mais promissores relatados para a aroeira vermelha (folhas e frutos) e arnica.

A atividade dos aditivos fitogênicos depende da natureza química e concentração dos compostos ativos. Amostras coletadas em várias localizações geográficas, em condições meteorológicas diferentes e em diferentes épocas do ano influenciam a atividade e concentração de seus compostos fitoquímicos. O

método de obtenção e o armazenamento destes também podem afetar a viabilidades de seus componentes ativos.

Dentre os compostos ativos em maior concentração nos aditivos extraídos de plantas do Cerrado, citam-se, no extrato seco de Pacari (*Lafoensia pacari*), o ácido elágico, precursor de taninos hidrolisáveis; no extrato seco de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), taninos condensados; na oleoresina extraída da Copaíba (*Copaifera langsdorffii*), ácidos resinosos e óleos essenciais, sendo o β -cariofileno em maior quantidade; e no óleo extraído dos frutos da Sucupira (*Pterodon emarginatus*), óleos essenciais como o β -cariofileno.

2.2.1 Extrato de Pacari

A *Lafoensia pacari* A. St.-Hill (Lythraceae) é árvore conhecida popularmente como Dedaleiro, Didal, Mangabeira-brava ou Pacari. Na análise fitoquímica do extrato metanólico da casca do caule desta planta, TAMASHIRO FILHO et al. (2012) detectaram a presença de taninos, saponinas, esteróides, triterpenóides, fenóis simples e ácido elágico como o componente principal.

LIMA et al. (2006) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *L. pacari* contra bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*). PORFÍRIO et al. (2009) verificaram um amplo espectro de ação do extrato hidroalcoólico obtido das folhas e da casca do caule de *L. pacari* contra 42 linhagens de bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*).

Quanto ao potencial antifúngico, no trabalho de SILVA JUNIOR et al. (2010) o extrato etanólico de *L. pacari* e o ácido elágico exibiram atividade contra *Candida* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*, porém não mostraram ação contra fungos filamentosos e dermatófitos. Os resultados indicaram que o ácido elágico pode ser o principal composto antifúngico presente no extrato de *L. pacari*, sugerindo que o modo de ação pode estar relaciona à parede celular fúngica.

2.2.2 Extrato de Barbatimão

A *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville é uma leguminosa arbórea conhecida popularmente como Barbatimão. SANTOS et al. (2002)

detectaram a presença de ácido gálico e taninos condensados formados por unidades de prodelfinidinas (galocatequina e/ou epigalocatequina), como principais metabólitos secundários que conferem propriedades antimicrobianas ao extrato da casca do caule do Barbatimão.

Flavonóides foram detectados apenas no extrato obtido das folhas do *S. adstringens* (SANTOS et al., 2002). SOUZA et al. (2007) também não encontram a presença de saponinas e flavonóides no extrato etanólico da casca do Barbatimão que apresentou um teor de $17,45 \pm 0,50\%$ de fenóis totais constituídos exclusivamente de taninos. No entanto, MACEDO et al. (2007) verificaram a presença de saponinas e flavonóides também no extrato da casca de Barbatimão. AUDI et al. (2004) verificaram que o conteúdo de taninos na casca do caule foi cerca de duas vezes maior que nas folhas do *S. adstringens*.

No estudo de GONÇALVES et al. (2005), o extrato hidroalcoólico da casca do caule de Barbatimão apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*; e gram negativas: *Escherichia coli*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*, mas não inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (gram negativa). No entanto, AUDI et al. (2004) constataram atividade antimicrobiana de um extrato semipurificado de *S. adstringens* contra *Pseudomonas aeruginosa*.

SOUZA et al. (2007) verificaram que o extrato seco das cascas de Barbatimão apresentou atividade bactericida frente a *Staphylococcus aureus* (gram positiva), *Staphylococcus epidermidis* (gram positiva) e *Escherichia coli* (gram negativa), demonstrando o potencial antimicrobiano deste produto.

2.2.3 Óleoresina de Copaíba

A *Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae), conhecida como Copaíba, é uma árvore de grande porte encontrada em todo o Brasil, inclusive no Bioma Cerrado. A óleoresina extraída do tronco de várias espécies de Copaíba contém cerca de 28 ácidos resinosos e mais de 40 óleos essenciais (VEIGA JR. & PINTO, 2002; BIAVATTI et al., 2006).

No estudo de ARAUJO (2010), as frações voláteis de Copaíba zoró e Copaíba vermelha (*Copaifera langsdorffii*) apresentaram 21,9 e 56,5% de trans-

cariofileno, 11,4 e 0% de α -trans-bergamoteno, 9,1 e 0% de β -bisaboleno, e 8,6 e 5,9% de α -copaeno, respectivamente. No trabalho de GELMINI et al. (2013) a fração volátil da óleoresina extraída de *C. langsdorffii* Desf. apresentou α -bergamoteno (48,38%), α -himachaleno (11,17%), β -selineno (5,00%) e β -cariofileno (5,47%). O resíduo da óleoresina, após derivatização, mostrou como componentes principais os ácidos copálico, abiético, daniellico, lambertínico, labd-7-en-15-óico, pimarico, isopimarico e kaur16-en18-óico.

Muitos trabalhos demonstram a atividade antimicrobiana do óleo de Copaíba contra microrganismos gram positivos e gram negativos (MENDONÇA & ONOFRE, 2008). PIERI et al. (2012) mostraram que três espécies de bactérias gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. flexneri*) e uma espécie gram positiva (*S. aureus*) foram inibidas por duas soluções com concentração final de 10% de óleo, sendo uma de *C. langsdorffii* e outra de *C. officinalis*.

PIERI et al. (2012) e SANTOS et al. (2008) verificaram a resistência de *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* para óleos extraídos de diferentes espécies de Copaíba. No entanto, no trabalho de GONÇALVES et al. (2005) o extrato hidroalcoólico da casca do caule da *C. langsdorffii* apresentou atividade antimicrobiana somente contra as bactérias gram negativas *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei*. Os autores atribuem estas inconsistências à variação na composição química comumente relatada entre diferentes espécies e mesmo entre árvores da mesma espécie.

2.2.4 Óleo de Sucupira

A *Pterodon emarginatus* Vogel (Fabaceae), conhecida como Sucupira branca ou faveira, é uma árvore pertencente à família Leguminosae-Papilonoideae. Floresce a partir do mês de setembro, logo podem ser observados frutos do tipo sâmara, onde fica armazenado o óleo medicinal.

DUTRA et al. (2012) identificaram onze compostos no óleo essencial dos frutos de *P. emarginatus* Vogel, sendo que os principais compostos, com concentrações superiores a 5%, foram o *trans*-cariofileno (35,9%), o β -elemeno (15,3%), o germacreno-D (9,8%), o α -humuleno (6,8%), o biciclogermacreno (5,5%) e o espatulenol (5,9%).

TOLEDO et al. (2011) verificaram que o extrato alcoólico (27,1%) de *P. emarginatus* Vogel apresentou concentração inibitória mínima $\geq 1000 \mu\text{g/ml}$ para as bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e para fungos (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*). Na avaliação de GONÇALVES et al. (2005) apenas a bactéria gram negativa *Proteus mirabilis* foi sensível à presença do extrato hidro-alcoólico (10,0%) do óleo do fruto de *P. emarginatus* Vogel.

No estudo de DUTRA et al. (2009), o óleo essencial obtido das sementes de *P. emarginatus* inibiu o crescimento de *S. aureus* (gram positiva), na concentração mínima de 2,5 mg/mL, demonstrando atividade bactericida decorrente da presença dos constituintes *trans*-cariofileno e α -humuleno. O óleo essencial não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. mutans* (gram positiva), *P. aeruginosa* (gram negativa), *E. coli* (gram negativa) e *C. albicans* (fungo).

SILVA et al. (2005) constataram o potencial antimicrobiano do óleo bruto do fruto de Sucupira sobre o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos. Contra fungos (*Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Ceratocystis fimbriata*) e bactérias gram positivas (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*) e gram negativas (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* e *Pseudomonas syringae*).

Na avaliação de GONÇALVES et al. (2005), o extrato hidroalcoólico do óleo do fruto de Sucupira demonstrou potencial antimicrobiano apenas contra uma espécie bacteriana gram negativa (*Proteus mirabilis*), demonstrando reduzido espectro de ação quando comparado à óleoresina de Copaíba e ao extrato da casca do Barbatimão.

2.3 Fermentação Ruminal *In Vitro*

Os sistemas *in vitro* são utilizados para determinar a digestibilidade principalmente de alimentos volumosos e nas fases iniciais de pesquisas. O aperfeiçoamento destes métodos permite a avaliação de diversos alimentos, bem como investigar os mecanismos de fermentação microbiana, o modo de ação de fatores antinutricionais e aditivos alimentares.

ALCADE et al. (2001) citam como vantagens dos métodos *in vitro*, o custo reduzido, a rapidez na obtenção dos resultados, o satisfatório controle ambiental e a possibilidade de trabalhar com grande número de tratamentos usando pouca quantidade de amostra. Neste sentido, observa-se na literatura um incremento no uso destas metodologias.

Recentemente, uma alternativa promissora para análise da digestibilidade é a técnica conhecida como fermentador ruminal Daisy^{II} (ANKOM[®], 2012). Seu princípio baseia-se no desaparecimento do alimento incubado na presença de fluido ruminal diluído em solução tampão. Permite a análise de um grande número de amostras e determinações da composição do resíduo contido nos saquinhos incubados com amostras de alimentos.

O fermentador Daisy^{II} possui quatro frascos de fermentação mantidos continuamente em agitação, sob temperatura previamente determinada (39,5 °C). Permite incubar diferentes alimentos (forragens e grãos) dentro do mesmo frasco, sendo considerado o material que desaparece como digerido (HOLDEN, 1999). No entanto, o aparelho e saquinhos são fabricados apenas nos Estados Unidos.

Em virtude desta limitação, a empresa brasileira TECNAL (Piracicaba/SP) desenvolveu o fermentador TE-150, similar ao Daisy^{II}, no qual tem sido aplicada a técnica da ANKOM (2012) validada por HOLDEN (1999). No entanto, esta metodologia destina-se a avaliar apenas a extensão da digestão do alimento no rúmen. A mesma foi adaptada para descrever a cinética de degradação ruminal dos nutrientes dietéticos (TOMICH et al., 2006).

Neste sentido, utilizam-se diferentes tempos de incubação dos alimentos na fase fermentativa da técnica de digestibilidade *in vitro* (HOLDEN 1999) como acontece nos ensaios *in situ*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Período Experimental

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal de Goiás (UFG), situada no município de Goiânia-GO, no período de julho de 2011 a setembro de 2012.

3.2 Tratamentos e Delineamento Experimental

Os aditivos fitogênicos foram fornecidos pelo Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Faculdade de Farmácia da UFG.

Foi utilizada a mesma dieta nos quatro ensaios conduzidos. Os tratamentos correspondem à inclusão das doses 0, 30, 300 e 3.000 mg / Litro de fluído ruminal tamponado dos seguintes aditivos fitogênicos:

Ensaio 1: Extrato seco de Pacari (*Lafoensia pacari*);

Ensaio 2: Extrato seco de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*);

Ensaio 3: Óleoresina de Copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.);

Ensaio 4: Óleo total dos frutos de Sucupira (*Pterodon emarginatus*).

Os experimentos foram delineados em blocos completos ao acaso, com quatro tratamentos. Cada uma das quatro incubações foi considerada um bloco.

Para a obtenção dos extratos secos (Pacari e Barbatimão), inicialmente a matéria-prima vegetal (cascas do caule) foi submetida a maceração prévia por 24 horas e em seguida à percolação em temperatura ambiente até esgotamento do pó. No processo extrativo foram utilizados percoladores de aço inox tipo 304 (capacidade de 10 litros) e mistura etanol/água destilada como líquido extrator na proporção 80:20 v/v. O extrato líquido foi concentrado em rotaevaporador e posteriormente procedeu-se à secagem em Spraydrier usando maltodextrina como adjuvante.

O óleo dos frutos de Sucupira foi obtido por prensagem a frio. A óleoresina de Copaíba foi adquirida de uma cooperativa do Amazonas e comprovada sua pureza pelo controle de qualidade do LPPN.

3.3 Dieta Experimental e Preparo do Substrato

Na dieta experimental (50:50, V:C) o volumoso usado foi feno de Tifton 85 (50%) e o concentrado formulado à base de milho moído (29,4%), farelo de soja (19,1%) e núcleo mineral (1,5%) sem qualquer tipo de aditivo ou uréia. A dieta moída a 1mm em moinho tipo Willey constituiu o substrato incubado no sistema *in vitro* durante 3, 6, 12, 24, 48, 72, e 96 horas.

Os ensaios com extrato secos de Pacari e Barbatimão foram realizados em um primeiro momento, a composição bromatológica da dieta foi de 91% MS, 20% PB, 39%, 1,63% EE, FDN, 16% FDA, 6,1% MM. Nos ensaios com óleos de Copaíba e Sucupira, realizados posteriormente a composição foi de 90% MS, 20% PB, 2,24% EE, 36% FDN, 13% FDA, 5,5% MM.

Foram confeccionados saquinhos de TNT com dimensões 5,0 x 5,0 cm, com gramatura 100. Em cada saquinho adicionou-se 0,5 g de dieta sendo então selados. Foram acondicionados em cada frasco de digestão da incubadora TE-150 (TECNAL) 22 saquinhos dos quais 21 contendo substrato (3 amostras para cada um dos 7 tempos de incubação) e 1 branco (vazio). O peso final do saquinho branco (saco lacrado vazio) foi utilizado para calcular o fator de correção. O valor da degradabilidade para cada tempo de incubação foi calculado pela média das amostras incubadas em triplicata.

3.4 Coleta e Preparo do Fluido Ruminal

Foi utilizado o conteúdo ruminal de um bovino canulado no rúmen, macho, castrado, da raça Holandesa, com 24 meses de idade, pesando aproximadamente 360 kg, recebendo dieta (50:50) à vontade 14 dias antes da primeira coleta, formulada para atender suas exigências nutricionais, utilizando o software NRC (1996).

O volumoso usado foi bagaço de cana *in natura* (50%) e concentrado constituído de milho moído (29,4%), farelo de soja (19,1%) e núcleo mineral (1,5%) sem qualquer tipo de aditivo ou uréia. A dieta apresentou composição bromatológica de 74% MS, 14% PB, 63% FDN, 36% FDA, 5,1% MM, 1,5% EE.

As coletas foram feitas durante a manhã antes do fornecimento da dieta. O conteúdo ruminal (2.000 mL) foi coletado manualmente em diferentes

pontos, liquidificado em alta velocidade por 30 segundos para desalojar os microrganismos aderidos à parte sólida, filtrado em tecido de algodão e colocado em garrafas térmicas para ser levado ao laboratório.

3.5 Condições da Incubação *In Vitro*

Os ensaios de fermentação ruminal *in vitro* foram conduzidos no Laboratório Multidisciplinar da Rede Produção Animal Sustentável (LAMUPAS) que pertence ao Departamento de Produção Animal (DPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da UFG.

Foram preparadas para cada frasco de digestão 1.600 mL de uma solução tamponante, 400 mL de fluido ruminal e a dose de aditivo. Os aditivos oleosos (Copaíba e Sucupira) foram diluídos em 2,5 mL de etanol, que também foi adicionado no frasco correspondente à dose 0 mg/L.

A solução tamponante foi composta de duas soluções tampão (A e B) em uma proporção de 1: 5 para obter um pH final de 6,8 a 39 °C. Composição das soluções tampão ANKOM (2012): A: KH_2PO_4 (10 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), NaCl (0,5 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L) e uréia (0,5 g/L); e solução tampão B: Na_2CO_3 (15,0 g/L) e $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L).

Os frascos de digestão foram colocados na incubadora aquecida a 39,5 °C, em seguida foram acondicionados os saquinhos contendo substrato, o líquido ruminal e doses de aditivos sob infusão constante de CO_2 .

Em cada tempo de incubação (3, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) três saquinhos foram removidos de cada frasco, colocados em água fria para paralisar a atividade microbiana e posteriormente lavados em água corrente, até que a água se apresentasse limpa. O mesmo processo foi feito com três saquinhos com substrato que não foram incubados (tempo zero). Retirado o excesso de água, os saquinhos foram levados à estufa de circulação forçada de ar a 55 °C por 72 horas e secos a 105 °C por 12 horas. Após esse período foram colocados em dessecador por 40 minutos e tiveram seus pesos registrados.

A mensuração do pH do inóculo ruminal e as coletas de alíquotas para análises de AGCC e N-NH_3 foram feitas após 96 horas de incubação.

3.6 Degradabilidade *In Vitro*

A degradabilidade *in vitro* da MS das amostras foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Deg}(\%) = \frac{A_i - (P_f - (S \cdot F))}{A_i} \cdot 100$$

Em que:

A_i: peso inicial do substrato multiplicado pelo teor de MS (determinado em estufa a 105 °C);

P_f: peso final (contém saquinho + substrato);

S: peso inicial do saquinho;

F: fator de correção (peso final do saquinho branco após incubação/peso do saquinho branco antes da incubação);

Os dados de degradabilidade obtidos foram ajustados pelo modelo de ØRSKOV & MCDONALD (1979), segundo a equação:

$$p = a + b (1 - e^{-ct})$$

Em que:

p = taxa de degradação no tempo t;

a = fração de rápida degradação (representado pelo intercepto da curva de degradação no tempo zero);

b = fração potencialmente degradável;

c = taxa horária de degradação da fração potencialmente degradável;

e = logarítmo natural de “-ct”;

t = tempo de incubação.

Sendo que $a + b \leq 100$.

As constantes a, b e c foram utilizadas para cálculos da degradabilidade potencial (a+b) e da degradabilidade efetiva conforme equação de ØRSKOV et al. (1980):

$$p = a + (bc)/(c + Kp)$$

Onde:

p = representa a taxa de degradabilidade efetiva;

a = é a interseção da curva no tempo zero, a fração rapidamente solúvel;
 b = é a fração potencialmente degradável, a fração degradada no tempo;
 c = é a taxa horária de degradação da fração potencialmente degradável;
 Kp = taxa estimada de passagem das partículas no rúmen por hora (2, 5 e 8%).

3.7 Digestibilidade Verdadeira

Os saquinhos retirados do sistema *in vitro* após 96 horas de incubação foram submetidos a digestão em detergente neutro em autoclave durante 1 hora (DETMAN et al., 2012). Posteriormente, foram lavados em água destilada até que todo o detergente fosse retirado e, em seguida, foram imersos em acetona durante cinco minutos, levados para estufa de ventilação forçada a 55 °C por 24 horas. Após essa etapa, os saquinhos foram levados para a estufa a 105 °C por 4 horas. A digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) foi calculada utilizando a fórmula (ANKOM, 2012):

$$\text{DIVMS (\%)} = \frac{100 - (W3 - (W1 \times C))}{(W2 \times \text{MS})} \times 100$$

Em que:

W1: peso do saquinho vazio;

W2: peso do substrato (amostra de dieta);

W3: peso final dos saquinhos após incubação e tratamento sequencial em detergente neutro;

C (Fator de correção): peso final do saquinho branco após incubação e tratamento sequencial em detergente neutro/peso do saquinho branco antes da incubação;

MS: Teor (%) de matéria seca do substrato.

3.8 Análises Laboratoriais

As análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos (LANA) da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da UFG. Os ingredientes da dieta foram analisados quanto ao teor de MS, PB, EE, MM, FDN e FDA segundo metodologias descritas por DETMAN et al. (2012).

As análises da concentração de N-NH₃ no inóculo ruminal foram realizadas no Laboratório de Fisiologia da Digestão do Instituto de Ciências Biológicas II da UFG. Foram determinadas por espectrofotometria conforme CHANEY & MARBACH (1962).

Para a determinação da concentração de AGCC, 1,6 mL de fluido ruminal tamponado foi centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos a 4 °C, com 0,4 mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% com ácido fórmico 98-100% + 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-butírico 100 mM. Após a centrifugação, as amostras foram congeladas e enviadas para análise em cromatógrafo gasoso no Laboratório de Nutrição Animal da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ, Piracicaba-SP.

3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software R (2012). As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott e utilizado nível de significância de 5%.

O modelo estatístico utilizado foi o seguinte:

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

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.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrato de Pacari

O extrato seco obtido da casca do caule de Pacari (*Lafoensia pacari*) utilizado neste estudo continha 27,5% de taninos totais, constituídos principalmente por taninos hidrolisáveis representados pelo ácido elágico. A análise qualitativa do mesmo revelou a presença de saponinas, como nos trabalhos de SILVA JUNIOR et al. (2010) e TAMASHIRO FILHO et al. (2012).

Na Figura 1 podem ser observadas as curvas de degradação da MS incubada na presença de doses do extrato seco de Pacari (*Lafoensia pacari*).

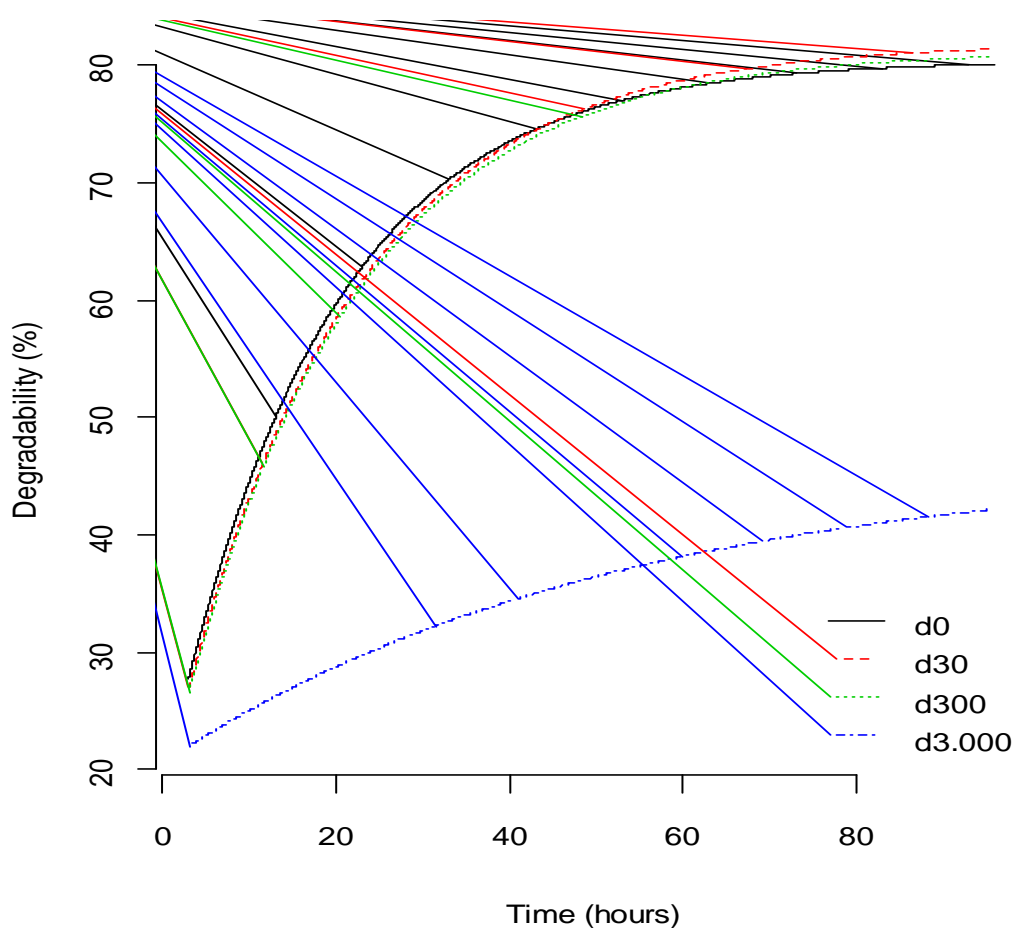


Figura 1. Curvas de desaparecimento da MS incubada na presença de doses do extrato seco de Pacari - *Lafoensia pacari* (d0: 0 mg/L; d30: 30 mg/L; d300: 300 mg/L; d3.000: 3.000 mg/L de fluido ruminal tamponado).

Ao avaliar a ação das doses crescentes do extrato seco de Pacari sobre a degradabilidade *in vitro* da MS constatou-se que não houve diferença para a variável “a”, que corresponde à fração de rápida degradação (Tabela 1). Para as variáveis “b” (fração potencialmente degradável), “c” (taxa horária de degradação da fração “b”), “De2%, De5% e De8%” (degradabilidade efetiva a uma taxa de passagem de 2%, 5% e 8% por hora) e para a degradabilidade potencial (a+b) as doses 0, 30 e 300 mg/L não diferiram entre si ($P > 0,05$); no entanto, apresentaram valores superiores em relação à dose 3.000 mg/L ($P < 0,05$) (Tabela 1).

TABELA 1- Degradabilidade *in vitro* da matéria seca da dieta em inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg de extrato seco de Pacari (*Lafoensia pacari*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
a (%)	18,4	18,0	17,5	20,5	1,09
b (%)	62,1 ^a	64,2 ^a	63,9 ^a	28,0 ^b	2,71
c (%/h)	0,055 ^a	0,050 ^a	0,050 ^a	0,019 ^b	0,0020
De (2%) ¹	63,8 ^a	63,7 ^a	63,1 ^a	33,2 ^b	1,16
De (5%) ²	50,8 ^a	50,0 ^a	49,5 ^a	27,7 ^b	0,77
De (8%) ³	43,6 ^a	42,6 ^a	42,2 ^a	25,5 ^b	0,66
Degradabilidade potencial	80,5 ^a	82,2 ^a	81,4 ^a	48,5 ^b	2,67

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$).
^{1,2,3}Degradabilidade efetiva a uma taxa estimada de passagem das partículas no rúmen de 2%, 5% e 8% por hora. *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

A inclusão de até 300 mg/L não demonstrou efeitos sobre a fermentação do substrato incubado ($P > 0,05$). Enquanto que a adição de 3.000 mg/L demonstrou um acentuado potencial antimicrobiano ($P < 0,05$), pois a degradabilidade potencial foi 40% menor para esta dose em relação à 0 mg/L.

Visto que taninos hidrolisáveis são rapidamente degradados em grupos fenólicos menores (HAGERMAN et al., 1992) e não formam complexos estáveis com macromoléculas (MONTEIRO et al., 2005), os resultados observados para a dose 3.000 mg do extrato de Pacari podem ser atribuídos à toxicidade dos taninos em altas concentrações, inibindo o crescimento dos microrganismos ruminais. SCALBERT (1991) relata como mecanismos de toxicidade de taninos a ação na

membrana celular e a inibição de enzimas digestivas microbianas. Isto causa prejuízos ao transporte de nutrientes para dentro da célula bacteriana, privando-a de substratos requeridos para seu crescimento e divisão.

As doses 0, 30 e 300 mg/L apresentaram valores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS) e concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) similares entre si ($P > 0,05$) e superiores à dose 3.000 mg/L ($P < 0,05$) (Tabela 2). Estes resultados comportam-se de acordo com a cinética de degradação ruminal da MS (Tabela 1). Considerando que uma quantidade menor de substrato foi fermentado na presença de 3.000 mg/L do aditivo fitogênico, espera-se menor produção e acúmulo dos produtos da fermentação.

Houve redução de 36% da DIVMS e de 47% da concentração de N-NH₃ no inóculo ruminal para a dose 3.000 mg/L comparada à dose 0 mg/L. Estes resultados estão de acordo com observações anteriores. Alguns autores relataram que, em altas concentrações, os taninos hidrolisáveis reduzem a digestibilidade da matéria seca por exceder a capacidade de resistência e desintoxicação dos microorganismos ruminais (DOCE et al. 2009; ABARGHUEI et al., 2011).

A adição de 300 e 3.000 mg/L do extrato de Pacari reduziu ($P < 0,05$) a concentração total de AGCC e de acetato (Tabela 2). Neste sentido, estes efeitos podem ser atribuídos à redução na degradação da parede celular vegetal, dificultando o acesso dos microorganismos ao conteúdo da célula. Esta pode ocorrer em virtude da inibição direta dos microorganismos (SCALBERT, 1991), uma vez que boa parte das bactérias fibrolíticas são gram positivas e, portanto, mais sensíveis à ação do aditivo, inibição de enzimas microbianas como pectinases e celulasas (McSWEENEY et al., 2001), ou pela formação de complexos indigestíveis com os carboidratos da parede celular (ABARGHUEI et al., 2011).

Além disso, sabe-se que os fungos presentes no ambiente ruminal degradam carboidratos fibrosos e causam fissuras nas partículas de alimento, auxiliando no processo de colonização bacteriana e acesso ao interior da célula. Pode ter ocorrido também a redução na população destes microorganismos, visto que, no estudo de SILVA JUNIOR et al. (2010) o extrato etanólico de *L. pacari* e o

ácido elágico exibiram atividade antifúngica, sugerindo que o modo de ação poderia estar associado à inibição da parede celular dos fungos.

TABELA 2 – Valores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS), concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e pH do inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg de extrato seco de Pacari (*Lafoensia pacari*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
DIVMS (%)	82,9 ^a	83,4 ^a	81,9 ^a	53,2 ^b	0,89
N-NH ₃ (mg/dL)	122,9 ^a	117,0 ^a	97,5 ^a	65,4 ^b	8,82
AGCC (mM)					
Total	62,9 ^a	57,6 ^a	50,9 ^b	42,3 ^b	3,41
Acetato	40,6 ^a	37,1 ^a	33,5 ^b	27,3 ^b	2,02
Propionato	11,9	11,2	9,7	8,4	0,79
Isobutirato	1,24 ^a	1,11 ^a	0,90 ^b	0,49 ^c	0,072
Butirato	5,6	5,0	4,1	4,2	0,44
Isovalerato	2,49 ^a	2,21 ^a	1,80 ^b	1,18 ^c	0,151
Valerato	1,11 ^a	1,00 ^a	0,87 ^a	0,61 ^b	0,067
C ₂ :C ₃	3,41	3,39	3,45	3,25	0,121
pH final	6,48	6,46	6,52	6,46	0,040

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

No presente estudo, a redução da concentração de N-NH₃ ocorreu devido à inibição da atividade fermentativa dos microrganismos ruminais, pela ação dos taninos hidrolisáveis, reduzindo a proteólise e deaminação de aminoácidos e, conseqüentemente, a concentração de N-NH₃. Assim como as bactérias fibrolíticas, a maior parte das bactérias proteolíticas são gram positivas, grupo este mais sensível à ação de aditivos fitogênicos.

A presença de saponinas no extrato seco de Pacari também pode ter contribuído para potencializar os efeitos de redução nas variáveis da cinética de degradação, da DIVMS e, conseqüentemente, na concentração dos produtos da fermentação microbiana ruminal. ABARGHUEI et al. (2011) alimentando ovelhas

com folhas de *Quercus Libani* Oliv., rica em taninos hidrolisáveis, constataram redução na população de bactérias celulolíticas e proteolíticas (gram positivas principalmente) e efeito defaunante sobre os protozoários atribuído à presença de saponinas na planta. De fato, LILA et al. (2003) observaram que a adição de saponina reduziu o desaparecimento *in vitro* da matéria seca de dieta contendo feno e concentrado, as concentrações de N-NH₃ e o número de protozoários.

Na Tabela 2, observa-se que a adição de 300 e 3.000 mg do extrato de Pacari foram capazes de alterar a fermentação microbiana ruminal, reduzindo a concentração total ($P < 0,05$) de AGCC, acetato, isobutirato e isovalerato. A dose 3.000 mg/L também reduziu a concentração de valerato, AGCC produzido pela condensação do acetil-CoA e propionil Co-A (KOSLOSKI, 2011). Não houve diferença ($P > 0,05$) para a concentração de propionato e butirato. Apesar da redução da concentração de acetato, a relação C₂:C₃ não foi alterada pelos tratamentos ($P > 0,05$).

A redução da degradação do substrato incubado na presença das doses do extrato seco de Pacari, causou a redução da concentração total de AGCC. No entanto, as concentrações individuais sugerem que o extrato de Pacari pode exercer efeito seletivo sobre os microrganismos ruminais. Isto fica claro devido à redução da concentração de acetato, produzido principalmente por bactérias gram positivas, sem afetar a concentração de propionato, geralmente produzido por bactérias gram negativas.

Os ácidos graxos de cadeia ramificada isobutirato e isovalerato são produzidos no catabolismo dos aminoácidos valina e leucina, respectivamente (KOZLOSKI, 2011). Em relação a 0 mg/L, as concentrações de isobutirato e isovalerato foram menores ($P < 0,05$) para a dose 3.000 mg/L (60,5 e 52,6%, respectivamente), seguida da dose 300 mg/L (27,4 e 27,7%, respectivamente). Estas reduções foram mais acentuadas do que as observadas para a concentração total de AGCC (32,8 e 19,1% para 3.000 e 300 mg/L, respectivamente) também em relação a 0 mg/L. O que permite supor a possibilidade de menor atividade deaminativa das bactérias ruminais. Para a dose 3.000 mg/L este efeito fica evidente, vista a redução de 47% da concentração de N-NH₃.

Como não existe absorção ou remoção dos produtos da fermentação (AGCC, ácido láctico, $N-NH_3$) no sistema *in vitro* utilizado no presente estudo, estas substâncias vão se acumulando no inóculo ruminal e suas proporções podem alterar o pH do meio. No entanto, neste estudo não houve diferença ($P > 0,05$) para os valores de pH final do inóculo ruminal submetido às diferentes doses do extrato de Pacari (Tabela 2).

4.2 Extrato de Barbatimão

A análise fitoquímica do extrato seco de Barbatimão utilizado no presente estudo apontou que o mesmo continha 52,2% de taninos totais, sendo rico em taninos condensados (polímeros de flavonóides). Segundo McSWEENEY et al. (2001), em condições anaeróbicas, não há relatos de despolimerização de taninos condensados por clivagem das ligações entre carbonos, portanto não ocorrem no rúmen. Em teste qualitativo, também foi revelada a presença de saponinas neste aditivo.

Na Figura 2 podem ser observadas as curvas de degradação da MS incubada na presença do extrato seco de Barbatimão. Observa-se na Tabela 3 que não houve diferença para a fração “a” (rápida degradação). Para as demais variáveis, a dose 3.000 mg/L apresentou resultados inferiores. Sendo que as doses 0, 30 e 300 mg/L foram similares. Para a maior dose (3.000 mg/L) houve redução de 54% da degradabilidade potencial em relação à dose 0 mg/L. Os resultados sugerem que a dose 3.000 mg/L foi excessivamente alta, prejudicando a atividade fermentativa dos microrganismos ruminais. Por outro lado, isto demonstra um efeito antimicrobiano do extrato da casca do caule de Barbatimão nas condições ruminais, atribuído à presença de taninos condensados.

SOUZA et al. (2007) e GONÇALVES et al., (2005) constataram um amplo espectro antimicrobiano do extrato hidroalcoólico da casca do caule de Barbatimão, agindo contra bactérias gram positivas e gram negativas. Estes efeitos podem ser associados a diferentes mecanismos. SCALBERT (1991) e McSWEENEY et al. (2001) citam interações com a membrana celular ou alterações no metabolismo microbiano; inibição de enzimas extracelulares (pectinases e celulases); e a privação de substratos para o crescimento microbiano pela formação de complexos com macromoléculas e íons metálicos.

REED (1995) relata que os taninos condensados podem induzir mudanças na morfologia de várias espécies bacterianas do rúmen, devido ao crescimento e divisão anormal das células.

Pode ter ocorrido redução da disponibilidade de N para síntese da proteína microbiana pela complexação dos taninos condensados com proteínas da dieta, uma vez que a concentração ruminal de N-NH_3 foi menor para dose 3.000 mg/L (Tabela 4). No entanto, este resultado pode ter sido em função de uma menor atividade fermentativa devido à toxicidade para os microrganismos, ou ainda pelos dois efeitos combinados.

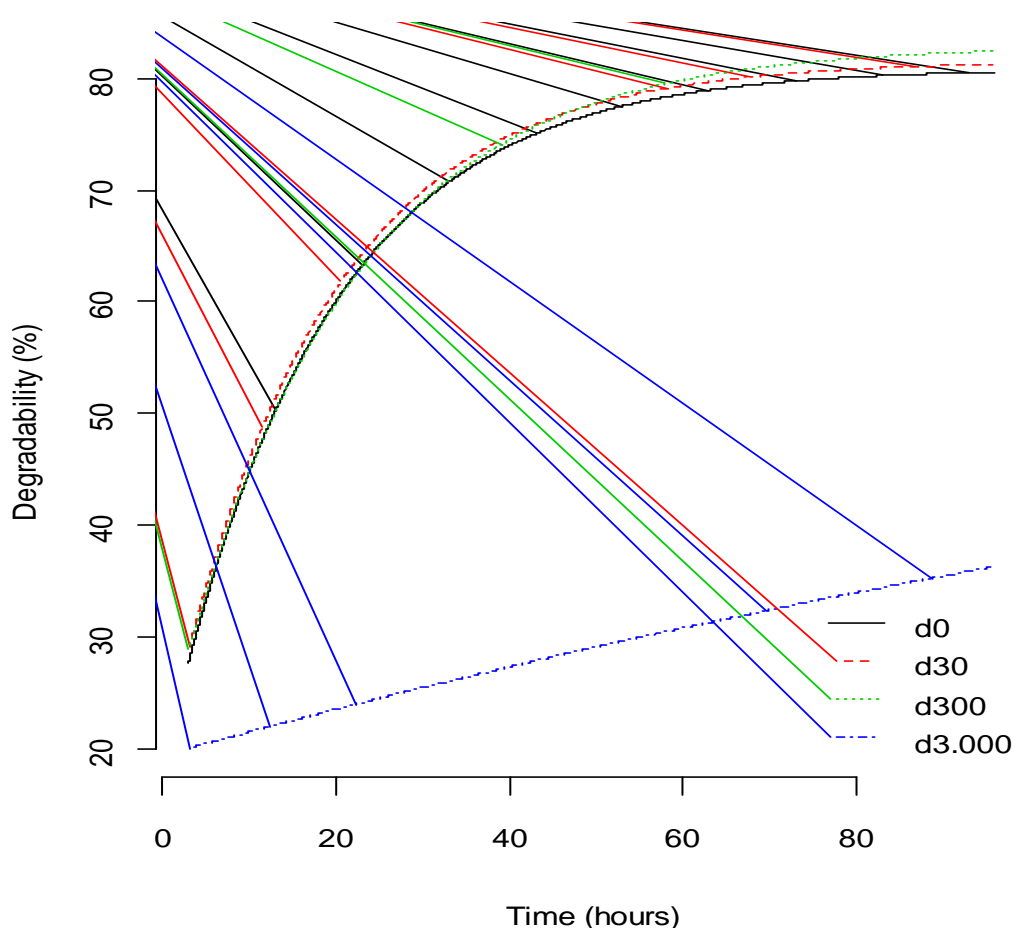


Figura 2. Curvas de desaparecimento da MS incubada na presença de doses do extrato seco de Barbatimão - *Stryphnodendron adstringens* (d0: 0 mg/L; d30: 30 mg/L; d300: 300 mg/L; d3.000: 3.000 mg/L de fluido ruminal tamponado).

TABELA 3 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca da dieta em inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg de extrato seco de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
a (%)	18,1	19,3	20,0	17,3	2,20
b (%)	62,9 ^a	62,3 ^a	63,0 ^a	20,0 ^b	1,16
c (%/h)	0,055 ^a	0,056 ^a	0,049 ^a	0,032 ^b	0,0050
De(2%) ¹	64,2 ^a	65,1 ^a	65,0 ^a	28,9 ^b	1,63
De(5%) ²	51,0 ^a	52,1 ^a	51,5 ^a	24,7 ^b	1,68
De(8%) ³	43,8 ^a	44,9 ^a	44,3 ^a	22,7 ^b	1,72
Degradabilidade potencial	81,1 ^a	81,6 ^a	83,0 ^a	37,2 ^b	1,81

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). ^{1,2,3} Degradabilidade efetiva a uma taxa estimada de passagem das partículas no rúmen de 2%, 5% e 8% por hora. *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

Apenas a dose 3.000 mg/L do extrato seco de Barbatimão foi capaz de alterar a fermentação microbiana ruminal. Na Tabela 4 pode ser observado que não houve diferença na DIVMS e na concentração de N-NH₃ para as doses 0, 30 e 300 mg/L ($P > 0,05$). Houve diferença ($P < 0,05$) apenas para a dose 3.000 mg/L, que, em relação à dose 0 mg/L, a DIVMS (51,05 vs 84,95%) e a concentração de N-NH₃ (63,90 vs 102,2 mg/dL) foram reduzidas em 40 e 37%, respectivamente.

KOZLOSKI et al. (2012) avaliando a infusão intraruminal em ovinos de 20, 40 e 60 g/kg MS dieta de extrato de *Acácia mearnsii* (72% de taninos totais), também observaram redução na digestibilidade da MS. Os autores relatam que os mecanismos responsáveis por este efeito não estão bem esclarecidos, mas as conseqüências esperadas incluem a diminuição da degradação de proteína no rúmen, o que reduz a concentração N-NH₃ no rúmen e o crescimento bacteriano. Para síntese proteica microbiana, bactérias que degradam a parede celular utilizam prioritariamente amônia como fonte de N, enquanto bactérias que fermentam açúcares, amido e fibra solúvel usam amônia, aminoácidos e peptídeos (KOZLOSKI, 2011).

A redução da concentração ruminal de N-NH₃ observada para a dose mais alta do extrato de Barbatimão (3.000 mg/L) se deve primeiramente à ação antimicrobiana que reduziu a população microbiana e, conseqüentemente, a fermentação do substrato. No entanto, pode ser associada à complexação dos taninos condensados com as proteínas, reduzindo a disponibilidade de N para os microrganismos (McSWEENEY et al., 2001), causando mudanças na população bacteriana. Como também as bactérias que realizam a proteólise e deaminação podem ser inibidas.

A inibição da deaminação de aminoácidos tem implicações práticas porque pode aumentar o escape ruminal de proteínas dietéticas e aumentar a eficiência de utilização de N no rúmen (VAN NEVEL & DEMEYER, 1988).

TABELA 4 – Valores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS), concentração de Nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e pH do inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg de extrato seco de Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
DIVMS (%)	85,0 ^a	84,0 ^a	83,4 ^a	51,1 ^b	1,61
N-NH ₃ (mg/dL)	102,2 ^a	105,9 ^a	97,9 ^a	63,9 ^b	6,43
AGCC (mM)					
Total	58,6 ^a	55,7 ^a	52,8 ^a	32,7 ^b	3,64
Acetato	36,8 ^a	37,1 ^a	33,5 ^a	20,9 ^b	2,56
Propionato	11,7	12,4	11,7	8,4	0,93
Isobutirato	1,08 ^a	1,11 ^a	0,92 ^a	0,36 ^b	0,063
Butirato	3,0	4,7	3,9	1,8	0,73
Isovalerato	2,12 ^a	2,19 ^a	1,82 ^a	0,89 ^b	0,114
Valerato	1,02 ^a	1,10 ^a	0,92 ^a	0,33 ^b	0,058
C ₂ :C ₃	3,26	2,99	2,90	2,47	0,208
pH final	6,48	6,46	6,43	6,52	0,050

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

Assim como as demais variáveis analisadas, em relação aos AGCC apenas a dose 3.000 mg/L do extrato seco de Barbatimão foi capaz de reduzir ($P < 0,05$) a concentração total de AGCC, de acetato, isobutirato, isovalerato e valerato. No entanto, as concentrações de propionato e butirato e a proporção $C_2:C_3$ não foram alteradas ($P > 0,05$) com a adição deste aditivo (Tabela 4).

A redução da concentração total de AGCC parece estar relacionada à acentuada redução na degradação da MS. Por outro lado, os resultados observados para as concentrações individuais sugerem que o aditivo extraído da casca do caule de Barbatimão apresentou efeito seletivo sobre os microrganismos ruminais, uma vez que reduziram a concentração de acetato sem afetar a concentração de propionato. Bactérias gram positivas são produtoras primárias de acetato, enquanto a produção de propionato geralmente é atribuída às bactérias gram negativas (KOZLOSKI, 2011).

Bactérias com alta capacidade deaminativa produzem isobutirato e isovalerato pelo catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada valina e leucina, respectivamente (KOZLOSKI, 2011). Embora parte da redução das concentrações destes isoácidos possa ser atribuída à queda na degradação do substrato, verifica-se a possibilidade de menor deaminação, evidenciada pela redução nas concentrações de $N-NH_3$. Ou ainda, existe a possibilidade da combinação de ambos efeitos.

Não houve diferença ($P > 0,05$) para os valores de pH final do inóculo ruminal entre as doses (Tabela 4). Em estudo *in vivo* BENCHAAAR et al. (2008b) não verificaram alterações no pH ruminal. MEZZOMO et al. (2011) testando a adição de 0,4% da MS de extrato de quebracho (76% de taninos condensados) na dieta de novilhos alimentados com 87% de concentrado, também não detectaram diferença ($P > 0,10$) no pH do fluido ruminal destes animais.

4.3 Óleoresina de Copaíba

A óleoresina extraída do tronco da Copaíba (*Copaifera langsdorffii*) pode conter em concentrações variadas, ácidos resinosos e principalmente óleos essenciais (BIAVATTI et al., 2006). A óleoresina utilizada neste estudo continha 21,31% de β -cariofileno, principal composto ativo presente no aditivo fitogênico.

ARAUJO (2010) relatou concentração similar (21,9%) para a copaíba zoró (*Copaifera langsdorfii*).

Na Figura 3 podem ser observadas as curvas de degradação da MS incubada na presença de doses da óleo resina de Copaíba.

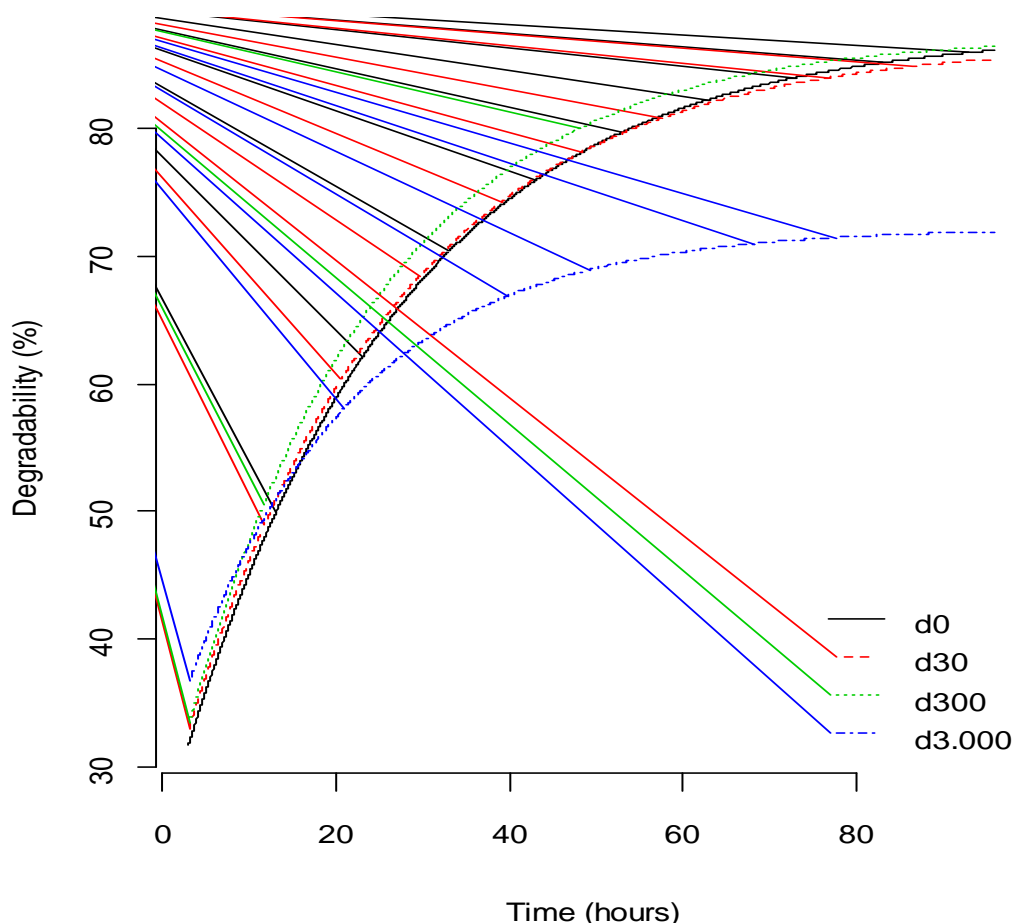


Figura 3. Curvas de desaparecimento da MS incubada na presença de doses da óleoresina de Copaíba - *Copaifera langsdorfii* (d0: 0 mg/L; d30: 30 mg/L; d300: 300 mg/L; d3.000: 3.000 mg/L de fluido ruminal tamponado).

Observa-se na Tabela 5 que no ensaio de degradabilidade realizado com óleoresina de Copaíba houve diferença ($P < 0,05$) para as variáveis fração “b” (potencialmente degradável) e degradabilidade potencial. Sendo que as doses 0, 30 e 300 mg/L foram similares entre si e apresentaram resultados superiores à dose 3.000 mg/L.

A dose mais alta (3.000 mg/L) foi capaz de inibir a fermentação do substrato incubado, visto uma menor degradabilidade potencial (Tabela 5) e

menor DIVMS (Tabela 6). Do ponto de vista prático, significa que o animal teria menor aproveitamento do alimento consumido.

TABELA 5 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca da dieta em inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg da óleoresina de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
a (%)	24,5	25,8	25,5	29,9	3,45
b (%)	63,4 ^a	61,1 ^a	61,9 ^a	45,3 ^b	2,93
c (%/h)	0,039	0,041	0,044	0,053	0,0071
De (2%) ¹	66,4	66,7	68,2	60,7	2,94
De (5%) ²	52,4	53,2	54,6	51,7	3,28
De (8%) ³	45,4	46,4	47,6	46,9	3,28
Degradabilidade potencial	88,0 ^a	86,9 ^a	87,4 ^a	75,2 ^b	1,41

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). ^{1,2,3} Degradabilidade efetiva a uma taxa estimada de passagem das partículas no rúmen de 2%, 5% e 8% por hora. *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

Observa-se na Tabela 6 que a DIVMS da dieta incubada na presença de 3.000 mg/L foi 10% inferior à da dose 0 mg/L. As doses 0, 30 e 300 mg/L foram similares ($P > 0,05$). Isto sugere que, como outros aditivos fitogênicos, em elevadas concentrações a óleoresina de Copaíba apresenta atividade antimicrobiana nas condições do ambiente ruminal.

As concentrações de N-NH₃ foram similares entre as doses 0 e 30 mg/L (126,5 e 120,2 mg/dL), e também entre as doses 300 e 3.000 mg/L (98,2 e 105,8 mg/dL) (Tabela 6). As duas maiores doses testadas (300 e 3.000 mg/L) apresentaram menor concentração de N-NH₃ no inóculo ruminal, sendo reduções de 22 e 16% comparadas à dose 0 mg/L, respectivamente. Resultados estes atribuídos à atividade antimicrobiana do aditivo e, conseqüentemente, à redução na degradação da proteína dietética. Uma vez que as bactérias proteolíticas são em sua maioria gram positivas, ou seja, possuem membrana celular menos complexa e menos seletiva, podem ser mais sensíveis às ações dos aditivos fitogênicos. NEWBOLD et al. (2004) sugerem que óleos essenciais agem sobre o metabolismo protéico reduzindo a deaminação, devido à inibição de bactérias hiperprodutoras de NH₃.

TABELA 6 – Valores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS), concentração de Nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e pH do inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg da óleo resina de Copaíba (*Copaifera langsdorffii*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
DIVMS (%)	91,6 ^a	90,6 ^a	90,2 ^a	82,4 ^b	0,89
N-NH ₃ (mg/dL)	126,5 ^a	120,2 ^a	98,2 ^b	105,8 ^b	4,84
AGCC (mM)					
Total	75,3	70,9	60,4	68,1	6,24
Acetato	48,1	45,9	39,0	42,6	3,11
Propionato	13,9	13,0	11,3	13,8	1,74
Isobutirato	1,41	1,34	1,05	1,20	0,118
Butirato	7,2	6,2	5,5	6,2	1,49
Isovalerato	2,97	2,82	2,23	2,56	0,243
Valerato	1,65	1,54	1,27	1,61	0,174
C ₂ :C ₃	3,67	3,68	3,56	3,23	0,35
pH final	6,16	6,21	6,22	6,16	0,050

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

Estes resultados são consistentes com o conhecimento da atividade antimicrobiana da óleoresina de Copaíba e concordam com outros estudos em que óleos essenciais tem sido suplementados em doses e condições semelhantes. Como no estudo de BUSQUET et al. (2006) em que foram avaliados 12 extratos e seis metabólitos secundários de plantas nas doses 3, 30, 300 e 3.000 mg/L em inóculo ruminal adaptado a dieta 50:50 (V:C). Os autores constataram que a dose 3.000 mg/L de extratos totais (óleo de capsicum, óleo de canela, óleo de broto de cravo, óleo de orégano) e óleos essenciais (cinamaldeído, carvacrol, carvona e eugenol), foi capaz de reduzir de 30 a 50% as concentrações de N-NH₃.

CARDOZO et al. (2005) verificando a diminuição da concentração de N-NH₃ com óleos essenciais puros (cinamaldeído e anetol) e extratos de anis,

canela, alho e pimenta sugere que estes aditivos diminuem a atividade de deaminação ou que as bactérias utilizaram peptídeos e aminoácidos (portanto não foram deaminados) como fonte de N, diminuindo a concentração de N-NH₃ no meio de incubação.

Vistas as reduções na fração potencialmente degradável, degradabilidade potencial (Tabela 5) e na DIVMS (Tabela 6), seria coerente observar queda na concentração de AGCC. Ao contrário do esperado, a concentração de AGCC e a relação C₂:C₃ não foram afetadas ($P > 0,05$) pelas doses da óleoresina de Copaíba. BUSQUET et al. (2006) constataram redução na concentração de AGCC para a dose 3.000 mg/L para vários compostos secundários de plantas adicionados a inóculo ruminal adaptado a uma dieta 50:50 (V:C). Da mesma forma, CASTILEJOS et al. (2006) relataram diminuição na concentração de AGCC para a dose de 5.000 mg/L dos cinco óleos essenciais avaliados (eugenol, guaiacol, limoneno, timol e vanilina) em uma dieta 60:40 (V:C). No entanto, isto pode ser explicado pelo fato de que os efeitos sobre as variáveis relacionadas à digestão do substrato foram pouco acentuados, não sendo capazes de alterar a concentração dos produtos finais da fermentação microbiana ruminal.

O pH final do inóculo ruminal (Tabela 6) não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. ARAUJO (2010) também não detectou diferenças entre os valores de pH final do controle (6,75) e de das doses 75 e 150 µL/75 mL de fluido ruminal tamponado de óleos resinóides de Copaíba zoró - *Copaifera langsdorfii* - (6,65 e 6,66) e Copaíba vermelha - *Copaifera langsdorfii* - (6,69 e 6,67), em dieta de alta inclusão de concentrado.

Da mesma forma que no presente estudo, ARAUJO (2010) verificou que as óleoresinas de Copaíba pouco alteraram a fermentação ruminal *in vitro*, especialmente quando o substrato era constituído exclusivamente de forragem. O autor atribuiu esta baixa intensidade dos efeitos à característica viscosa dos óleos resinóides pode ter dificultado a interação dos mesmos com o meio de incubação e a colonização do substrato pelos microorganismos.

4.4 Óleo de Sucupira

O óleo bruto extraído dos frutos de Sucupira utilizado neste trabalho continha 5,3% de β -cariofileno, sendo este um dos principais óleos essenciais presente no aditivo. Na avaliação da cinética de degradação da MS no rúmen na presença do óleo de Sucupira as variáveis “b” (fração potencialmente degradável) e degradabilidade potencial apresentaram diferenças ($P < 0,05$) entre as doses avaliadas (Tabela 7).

Na Figura 4 podem ser observadas as curvas de degradação da MS incubada na presença de doses do óleo bruto extraído dos frutos de Sucupira.

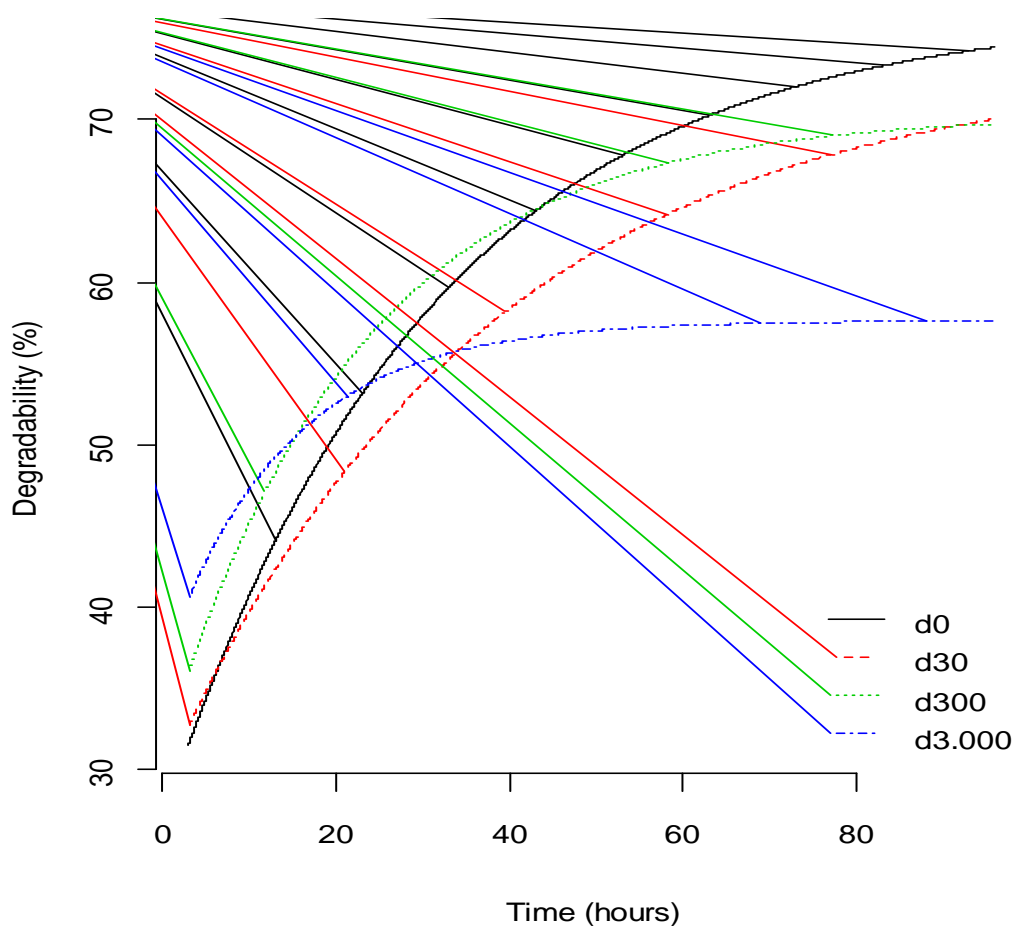


Figura 4. Curvas de desaparecimento da MS incubada na presença de doses do óleo bruto extraído dos frutos de Sucupira - *Pterodon emarginatus* (d0: 0 mg/L; d30: 30 mg/L; d300: 300 mg/L; d3.000: 3.000 mg/L de fluido ruminal tamponado).

TABELA 7 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca da dieta em inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg de óleo dos frutos de Sucupira (*Pterodon emarginatus*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3.000	
a (%)	22,6	25,4	25,8	32,6	4,88
b (%)	60,4 ^a	58,0 ^a	47,5 ^b	32,1 ^c	2,59
c (%/h)	0,033	0,025	0,053	0,055	0,0079
De (2%) ¹	59,9	56,5	60,0	55,5	2,87
De (5%) ²	46,4	44,2	50,0	48,9	3,06
De (8%) ³	40,1	38,9	44,5	45,3	3,27
Degradabilidade potencial	83,0 ^a	83,4 ^a	73,3 ^b	64,8 ^b	3,34

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). ^{1,2,3} Degradabilidade efetiva a uma taxa estimada de passagem das partículas no rúmen de 2%, 5% e 8% por hora. *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

Para a fração “b” a dose 3.000 mg/L apresentou o menor valor (32,14%), seguido da dose 300 mg/L (47,51%). As doses 0 e 30 mg/L foram similares entre si ($P > 0,05$), apresentando valores de 60,41 e 58,01%, respectivamente. A degradabilidade potencial foi similar entre as doses 0 e 30 mg/L ($P > 0,05$), e também entre as doses 300 e 3.000 mg/L ($P > 0,05$). Sendo que, as duas maiores doses testadas foram capazes de alterar a cinética de degradação ruminal *in vitro* da MS.

Na Tabela 8 observa-se que a DIVMS da dieta foi 24% menor para a dose 3.000 mg/L em relação a 0 mg/L e foi similar entre as doses 0, 30 e 300 mg/L. Estes resultados podem ser atribuídos à ação antimicrobiana deste aditivo fitogênico, reduzindo a atividade fermentativa dos microrganismos.

Os ácidos graxos de cadeia curta são os produtos finais da fermentação microbiana ruminal e representam a principal fonte de energia metabolizável para ruminantes (VAN SOEST, 1982). Desta forma, na prática, uma redução na sua produção seria nutricionalmente desfavorável para o animal.

TABELA 8 – Valores de digestibilidade *in vitro* da MS (DIVMS), concentração de Nitrogênio amoniacal (N-NH₃), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e pH do inóculo ruminal contendo 0, 30, 300 e 3.000 mg de óleo total dos frutos de Sucupira (*Pterodon emarginatus*)

Variáveis	Doses (mg/L)*				EPM**
	0	30	300	3,000	
DIVMS (%)	87,3 ^a	86,1 ^a	84,1 ^a	66,3 ^b	1,81
N-NH ₃ (mg/dL)	112,1	110,0	100,4	100,0	8,00
AGCC (mM)					
Total	72,7	70,5	65,7	61,0	3,27
Acetato	52,1	47,4	45,2	40,9	1,77
Propionato	10,0	10,7	10,1	9,9	0,88
Isobutirato	1,12	1,13	0,98	0,97	0,05
Butirato	4,5	6,4	4,9	4,6	1,05
Isovalerato	3,23	3,41	3,08	2,43	0,35
Valerato	1,70	1,50	1,44	2,21	0,25
C ₂ :C ₃	5,21	4,54	4,58	4,42	0,37
pH final	6,07 ^a	6,12 ^a	6,17 ^a	6,34 ^b	0,050

Letras minúsculas nas linhas diferem entre si pelo teste Scott-Knott ($P < 0,05$). *mg/Litro de fluido ruminal tamponado. **Erro padrão da média.

Ao contrário do esperado, vista a redução da degradação da MS, as concentrações de N-NH₃, de AGCC e a proporção molar C₂:C₃ não foram alteradas ($P > 0,05$) pela adição do óleo dos frutos de Sucupira (Tabela 8). Estes resultados sugerem reduzida capacidade deste aditivo fitogênico em alterar a fermentação microbiana ruminal. Visto que microrganismos produtores de acetato e butirato, e que realizam proteólise e deaminação, podem ser tolerantes à presença do óleo de Sucupira. No entanto, assim como observado para óleoresinas de Copaíba (ARAUJO, 2010), a alta viscosidade do óleo extraído dos frutos de Sucupira pode ter dificultado sua interação com o meio de incubação, ou mesmo o processo de colonização do substrato pelos microrganismos, acarretando a ausência de efeitos sobre os produtos da fermentação da dieta.

Na Tabela 8 pode-se observar que o pH final da dose 3.000 mg/L ($P < 0,05$) foi mais elevado que os demais, sendo valores de 6,07, 6,12, 6,17 e 6,34 para as doses 0, 30, 300 e 3.000 mg/L, respectivamente. Mesmo não havendo diferença estatística para a concentração total de AGGC, a redução destes pode ser responsável pela elevação do pH final do inóculo ruminal na presença da dose 3.000 mg/L do óleo de Sucupira.

Nas observações de BUSQUET et al. (2006) a maioria dos óleos testados na dose a 3.000 mg/L elevaram o pH do meio de cultura, uma vez que reduziram as concentrações de AGCC. CASTILEJOS et al. (2006) também verificaram aumento no pH do meio de cultura após 24 horas de incubação de dieta 60:40 (V:C) na presença de cinco óleos essenciais (eugenol, guaiacol, limoneno, timol e vanilina) na concentração de 5.000 mg/L, devido à redução na concentração de AGCC.

Os resultados evidenciam que a propriedade antimicrobiana do óleo de Sucupira sobre os microrganismos do rúmen ocorre na presença de alta concentração deste composto.

Encontrar doses capazes de manipular positivamente a fermentação ruminal com pouco ou nenhum efeito inibitório sobre a fermentação total é o grande desafio das pesquisas com extratos de plantas (ARAUJO, 2010).

5 CONCLUSÃO

De forma geral, compostos secundários de plantas são potencialmente úteis para manipular a fermentação ruminal. Os aditivos extraídos de Pacari, Barbatimão, Copaíba e Sucupira apresentaram efeitos antimicrobianos em intensidades variáveis.

Efeitos mais promissores foram observados para o óleo de Sucupira. Investigações de doses entre 300 e 3.000 mg/L devem ser realizadas em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABARGHUEI, M.J.; ROUZBEHAN, Y.; ALIPOUR, D. Effect of oak (*Quercus libani* Oliv.) leaf tannin on ruminal fermentation of sheep. **Journal Agriculture Science Technology**, Amsterdam, v. 13, n. Supplementary, p.1021-1032, 2011.
2. ALCALDE, C. R; MACHADO, R. M; SANTOS, G. T; PICOLLI, R; JOBIM, C. C. Digestibilidade *in vitro* de alimentos com inóculos de líquido de rúmem ou de fezes de bovinos. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 917-921, 2001.
3. ANKOM, Technology. **Method 3: *In vitro* true digestibility using the DAISYII Incubator.** Disponível em: http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf. Acesso em 29 de janeiro de 2012.
4. 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.
5. AUDI, E.A.; TOLEDO, C.E.M.; SANTOS, F.S.; BELLANDA, P.R.; PRADO, W.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; SAKURAGUI, C.M.; AMADO, C.A.B.; MELLO, J.C.P. Biological Activity and Quality Control of Extract and Stem Bark From *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v.23 n.3, p.328-33, 2004.
6. AUGUSTIN, J.M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S.B.; BAK, S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, New York, v.72, n. 6, p.435–457, 2011.
7. BENCHAAR, C.; CALSAMIGLIA, S.; CHAVES, A.; FRASER, G.; COLOMBATTO, D.; McALLISTER, T.; BEAUCHEMIN, K. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.145, n.1-4, p.209-228, 2008a.
8. BENCHAAR, C.; McALLISTER, T.A.; CHOUINARD, P.Y. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, Quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, n.12, p.4765-77, 2008b.
9. BHATTA, R.; UYENO, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; YABUMOTO, Y.; NONAKA, I.; ENISHI, O.; KURIHARA, M. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, n.11, p.5512–5522, 2009.
10. BIAVATTI, M.W.; DOSSIN, D.; DESCHAMPS, F.C.; LIMA, M.P. Análise de óleosresinas de Copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.2, p.230-235, 2006.

11. BODAS, R.; LOPEZ, S.; FERNANDEZ, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; RODRIGUEZ, A.B.; WALLACE, R.J.; GONZALEZ, J.S. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.145, n.1-4, p.245–258, 2008.
12. BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.2, p.761-771. 2006.
13. 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.
14. CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.83, n.11, p.2572–2579, 2005.
15. 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**, Champaign, v.82, n.11, p.3230-3236, 2004.
16. CASTILLEJOS, L.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, n.7, p.2649–2658, 2006.
17. CASTRO-MONTOYA, J.; CAMPENEERE, S.; VAN RANST, G.; FIEVEZ, V. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on *in vitro* methane and VFA production. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.176, n.1, p.47–60, 2012.
18. CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.8, n.2, p.130–132, 1962.
19. CHEEKE, P.R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, n. Especial Supplemt, p.1–10, 2000.
20. DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M; AZEVEDO, J.A. **Métodos para análise de alimentos –Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal**. 1 ed., Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2012. 214p.
21. DOCE, R.R., HERVAS, G., BELENGUER, A., TORAL, P.G., GIRALDEZ, F.J., FRUTOS, P. Effect of the administration of young oak (*quercus pyrenaica*) leaves to cattle on ruminal fermentation. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.150, n.1, p.75-85, 2009.

22. DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.88, n.2, p.308–316, 2000.
23. DUTRA, RAFAEL C.; PITTELLA, F.; DITZ, D.; MARCON, R.; PIMENTA, D.S.; LOPES, MIRIAM T.P.; RAPOSO, N.R.B. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v.22, n.5, p.971-978, 2012.
24. DUTRA, R.C.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D.; BARBOSA, N.R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, João Pessoa, v.19, n.2A, p.429-435, 2009.
25. FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: Reviews. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.88, n.6, p.587–605, 2002.
26. FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GIRÁLDEZ, F. J.; MANTECÓN, A. R. Review. Tannins and ruminant nutrition. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madrid, v.2, n.2, p.191-202, 2004.
27. GELMINI, F.; BERETTA, G.; ANSELMI, C.; CENTINI, M.; MAGNI, P.; RUSCICA, M.; CAVALCHINI, A.; FACINO, R.M. GC–MS profiling of the phytochemical constituents of the oleoresin from *Copaifera langsdorffii* Desf. and a preliminary in vivo evaluation of its antipsoriatic effect. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.440, n.2, p.170-178, 2013.
28. GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. **Journal of Applied Microbiology**, London, v.105, n.3, p.770-777, 2008.
29. GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.
30. HAGERMAN, A.E.; ROBBINS, C.T.; WEERASURIYA, Y.; WILSON, T.C.; McARTHUR, C. Tannin chemistry in relation to digestion. **Journal of Range Management**, Denver, v.45, n.1, p. 57-62, 1992.
31. 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.
32. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. Comunicação Social, 2004. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169. Acesso em 26 de janeiro de 2013.

- 33.KAMRA, D.N.; AGARWAL, N.; CHAUDHARY, L.C. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 156-163, 2006.
- 34.KLEVENHUSEN, F.; MURO-REYES, A.; KHIAOSA-ARD, R.; METZLER-ZEBELI, B.U.; ZEBELI, Q. A meta-analysis of effects of chemical composition of incubated diet and bioactive compounds on *in vitro* ruminal fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.176, n.1-4, p.61– 69, 2012.
- 35.KOZLOSKI, G.V.; HÄRTER, C.J.; HENTZ, F.; ÁVILA, S.C.; ORLANDI, T.; STEFANELLO, C.M. Intake, digestibility and nutrients supply to wethers fed ryegrass and intraruminally infused with levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.106, n.2, p.125– 130, 2012.
- 36.KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica de ruminantes**. 3 ed. Santa Maria: UFSM, 2011. 216p.
- 37.LILA, Z.A.; MOHAMMED, N.; KANDA, S.; KAMADA, T.; ITABASHI, H. Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, n.10, p. 3330-3336, 2003.
- 38.LIMA, M.R.F.; XIMENEZ, E.C.P.A.; LUNA, J.S.; SANT'ANA, A.E.G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.3, p.300-306, 2006.
- 39.MACEDO, F. M.; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. Triagem Fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 1166-1168, 2007.
- 40.McSWEENEY, C.S.; PALMER, B.; MCNEILL, D.M.; KRAUSE, D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.91, n.1-2, p.83-93, 2001.
- 41.MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela Copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.2, p.577-581, 2009.
- 42.MEZZOMO, R.; PAULINO, P.V.R.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F.; MONNERAT, J.P.I.S.; DUARTE, M.S.; SILVA, L.H.P.; MOURA, L.S. Influence of condensed tannin on intake, digestibility, and efficiency of protein utilization in beef steers fed high concentrate diet. **Livestock Science**, Amsterdam, v.141, n.1, p.1–11, 2011.
- 43.MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.5, p.892-896, 2005.
- 44.NEWBOLD, C.J.; McINTOSH, F.M.; WILLIAMS, P.; LOSA, R.; WALLACE, R.J. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation.

- Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.114, n.1/4, p.105-112, 2004.
45. NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**, 7 ed., National Academic Press, Washington, 1996.
 46. O'DONOVAN, L.; BROOKER, J. D. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. **Microbiology**, Great Britain, v.147, n.4, p.1025–1033, 2001.
 47. OJEU. Regulation (EC) Nº 1831/2003 of the European parliament and the council of 22 september 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L268, p. 29-43, 2003. Disponível em: <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/SiteCollectionDocuments/EC-1831-2003.pdf>. Acesso em 25 de janeiro de 2013.
 48. ØRSKOV, E.R.; HOVELL, F.D.; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. **Tropical Animal Production**, Santo Domingo, v.5, n.3, p.195-213, 1980.
 49. ØRSKOV, E.R.; MCDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, Cambridge, v.92, n.2, p.499-453, 1979.
 50. PATRA, A.K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, New York, v.71, n.11-12, p.1198–1222, 2010.
 51. PIERI, F.A.; SILVA, V.O.; SOUZA, C.F.; COSTA, J.C.M.; SANTOS, L.F.; MOREIRA, M.A.S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.1, p.241-244, 2012.
 52. PORFÍRIO, Z.; MELO-FILHO, G.C.; ALVINO, V.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A. E.G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Maringá, v.19, n.3, p.785-789, 2009.
 53. R, The R Development Core Team. **R: A Language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 1706p, 2012.
 54. REED, J.D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, n.5, p.1516-1528, 1995.
 55. SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, n.3, p. 277-281, 2008.

56. SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; RIBEIRO, J.P; GUIMARÃES, D.O.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.;SERAPHIN, J.C. Tannin composition of Barbatimão species. **Fitoterapia**, Milano, v.73, n.4, p.292-299, 2002.
57. SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, New York, v.30, n.12, p.3875-3883, 1991.
58. SILVA JUNIOR, I.F.; RAIMONDI, M.; ZACCHINO, S.; CECHELIN FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; RAO, V.S.; LIMA, J.C.S.; MARTINS D.T.O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Maringá, v.20, n.3, p.422-428, 2010.
59. 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.
60. SOLIVA, C.R.; AMELCHANKA, S.L.; DUVAL, S.M.; KREUZER, M. Ruminant methane inhibition potential of various pure compounds in comparison with garlic oil as determined with a rumen simulation technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.106, n.1, p. 114–122, 2011.
61. SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, n.1, p. 71-75. 2007.
62. TAMASHIRO FILHO, P.; BALOGUN, S.O.; ALMEIDA, D.A.T.; LIMA, J.C.S.; MARSON-ASCÊNCIO, P.G.; ASCÊNCIO, S.D.; SANTOS, F.R.; MARTINS, D.T.O. Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (*Lythraceae*) in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.144, n.3, p.497–505, 2012.
63. TOLEDO, C.E.M.; BRITTA, E.A.; CEOLLE L.F.; SILVA, E.R.; MELLO, J.C.P.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T. Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian Cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.133, n.2, p.420–425, 2011.
64. TOMICH, T.R.; PEREIRA, L.G.R.; GUIMARÃES JR, R.; GONÇALVES, L.C. **Adaptação de uma técnica "in vitro" para descrição da cinética de degradação ruminal da matéria seca de volumosos**. Embrapa Pantanal, Corumbá - MS. Comunicado Técnico Nº 57, 2006. 4p.
65. ULTEE, A.; BENNINK, 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**, Washington, v.68, n.4, p.1561-1568, 2002.

66. VAN NEVEL, C. J.; D. I. DEMEYER. Manipulation of rumen fermentation. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. P. N. Hobson, ed. Elsevier Applied Science: Londres, 1988, p. 387–443.
67. VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Comstock, Cornell University Press, New York, NY. 1982. 476 p.
68. VEIGA JR., V.F.; PINTO, A.C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.2, p.273-286, 2002.
69. YANG, W.Z.; BENCHAAR, C.; AMETAJ, B.N.; CHAVES, A.V.; HE, M.L.; MCALLISTER, T. A. Effects of garlic and juniper berry essential oils on ruminal fermentation and on the site and extent of digestion in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n.12, p. 5671-5681, 2007.