



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Extrato de Planta como Manipulador da Fermentação Ruminal

João Rafael de Assis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.
Área de concentração: Zootecnia.

Sinop, Mato Grosso

Junho de 2016

JOÃO RAFAEL DE ASSIS

Extrato de planta como manipulador da Fermentação Ruminal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Área de concentração: Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. André Soares Oliveira

Co-orientadora: Prof.^a Dr. Márcia Rodrigues C. Oliveira

Sinop, Mato Grosso

Fevereiro de 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

A848e Assis, João Rafael de.

Extrato de Planta como Manipulador da Fermentação Ruminal /
João Rafael de Assis. -- 2016
xiv, 27 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: André Soares de Oliveira.

Co-orientador: Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso,
Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia, Sinop, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Amônia. 2. Digestibilidade. 3. Metano. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
Avenida Alexandre Ferronato, 1200 - Reserva 35 - Distrito Industrial - Cep: -Sinop/MT
Tel : - Email : ppgzootecnia@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Extrato de planta como manipulador da Fermentação Ruminal"

AUTOR : Mestrando JOÃO RAFAEL DE ASSIS

Dissertação defendida e Aprovado em 10/02/2016.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador
Instituição : UFMT

Doutor(a) André Soares de Oliveira

Coorientador
Instituição : UFMT

Doutor(a) Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira

Examinador Interno
Instituição : UFMT

Doutor(a) Eduardo Henrique Bevilotti Kling de Moraes

Examinador Externo
Instituição : Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Doutor(a) Rafael Monteiro Araújo Teixeira

SINOP, 19/02/2016.

DEDICATÓRIA

Dedico a minha mãe Rosemeire Ap. Bosch, ao meu padrasto Luiz Carlos O. Sobral, a minha vó Inés Destefani Bosch, aos meus tios Elias Destefani e Roseli Destefani entre outros que me apoiaram até aqui... Dedico ao meu pai Ruy de Assis Júnior, por me mostrar o caminho da ciência, o mesmo já tendo partido... Sei que seus olhos não estarão abertos para o que há de acontecer... Porém minha mente, sempre abrigará seus ensinamentos que nunca serão em vão...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Rosemeire Ap. Bosch e meu padrasto Luiz Carlos O. Sobral, que me apoiaram em todos estes anos, também agradecer minha vó Inés Destefani Bosch, por sempre me ajudar dentro dos possíveis e aos meus tios Elias Destefani e Roseli Destefani, e entre outros que me apoiaram até aqui... Ao meu pai Ruy de Assis Júnior por ensinar a lutar por nossos ideais.

Junto há estes, dedico aos meus amigos, que me ajudaram dentre várias circunstâncias da vida, sendo assim a única família que você tem direito há escolha, já citada por Shakespeare. Por está razão sou feliz pelos amigos que fizestes até aqui... Sendo que alguns nomes veem facilmente em minha mente, como Fagner Júnior Gomes, Renan Machado Toniello, Silvio Júnior Manfroi, Darlan Nunes, Vinícius Baumann Santos, Vitor Hugo, Diego Bandeira, Caio Murakami, Joaquim A. Júnior, Diecson Franciskievicz, Fagner Barcelos, Romualdo Carvalho, Lucas Oline, Pâmella Franco entre outros. Agradeço especialmente ao Prof. André Soares de Oliveira, pela oportunidade e confiança concedida, pela dedicação a docência e pela orientação no presente trabalho. Sem dúvida este, não teria o mesmo valor sem sua participação...

Também agradecer a todos os professores que fizeram parte da minha caminhada, sem duvida todos tem uma participação especial na minha formação...

Agradeço a Universidade Federal de Mato Grosso/*Campus* de Sinop, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado em Zootecnia. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso, pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro à pesquisa (Projetos números 305826/2013-1, 207300/2014-3 e 478274/2012-2).

EPÍGRAFE

“O mundo não é um grande arco-íris, é um lugar sujo e cruel, que não quer saber o quanto você é durão, vai te colocar de joelhos e você ficará de joelhos para sempre se você deixar...”

“Você, eu, ninguém vai bater tão duro quanto há vida, mas não se trata de bater duro, se trata de quanto você aguenta apanhar e seguir em frente, o quanto você é capaz de tentar e continuar tentando...” É assim que se consegue vencer!

Rocky Balboa

BIOGRAFIA

JOÃO RAFAEL DE ASSIS, filho de Rosemeire Ap. Bosch e Ruy de Assis Junior, nascido em Sinop, Estado de Mato Grosso, em 05/02/1988.

Graduou em Zootecnia pela Universidade Federal de Mato Grosso/*Campus* de Sinop no ano de 2014, foi bolsista de Iniciação Científica PBIC/CNPq no projeto "Núcleo de Pesquisas em Pecuária de Leite" durante o período de Agosto de 2012 a Julho de 2013 e o mesmo foi monitor da Disciplina de Nutrição e Produção de Ruminantes, no período 2012/2 a 2013/1.

Iniciou o curso de Mestrando em Zootecnia pela Universidade Federal de Mato Grosso/*Campus* Sinop, na linha de pesquisa Nutrição e Alimentação Animal com ênfase em Ruminantes e Microbiologia Ruminal.

RESUMO

ASSIS, João Rafael de Assis. Dissertação de Mestrado (Zootecnia), Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, fevereiro de 2016, xiv, 27 f. **Extrato de Planta como Manipulador da Fermentação Ruminal**. Orientador: Prof. Dr. André Soares de Oliveira. Co-orientadora: Prof.^a Dr. Márcia Rodrigues Carvalho Oliveira.

A criação de animais ruminantes tem sofrido pressão da sociedade para minimizar o passivo ambiental da atividade. Os Zootecnistas ruminantes buscam elaborar dietas metabolicamente mais eficientes para os animais, entre outros, por meio do uso de aditivos moduladores da fermentação ruminal. A monensina é o aditivo mais comumente usado na dieta, mas em razão da pressão social para reduzir seu uso faz-se necessário investigar aditivos alternativos. O grupo de pesquisa em Pecuária de Leite da UFMT/SINOP desenvolveu um extrato de planta com potencial de manipular a fermentação ruminal (em processo envio de patente pelo Escritório de Inovação Tecnológica da UFMT). Assim, objetivou-se investigar efeitos da adição do extrato de planta sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com alto (90%, base da matéria seca) e baixo teor de forragem (15% base da matéria seca). Para cada condição dietética foi conduzido um ensaio de incubação ruminal *in vitro* em delineamento em blocos casualizados, utilizando um controle negativo (sem aditivo), um controle positivo (monensina sódica na dose de 30 mg/kg matéria seca de substrato; Rumensin® 100, Elanco, EUA) e três doses de extrato de planta (2, 4 e 6 mL/frasco de incubação de 160 mL). Cada unidade experimental foi representada por uma incubação *in vitro* de 72 horas sucessivas por inóculo-animal. Foram utilizados seis repetições por tratamento (três incubações $\times$ inóculo de dois animais). O extrato de planta, independente da dose (2, 4 ou 6 mL/500 mg de substrato), aumenta ($P < 0,05$) a digestibilidade *in vitro* da MS em dietas com alto teor de forragem e a produção de CH_4 por unidade de MS digerida, mas não afeta ($P > 0,05$) a produção de AGV e lactato, e a população de protozoários ciliados. Em dietas com baixo teor de forragem o extrato de planta não afeta ($P > 0,05$) a digestibilidade, a produção de AGV e lactato e também a população de protozoários ciliados, mas aumenta ($P < 0,05$) a produção de CH_4 . Todavia o estímulo da adição do extrato de planta na fermentação ruminal ocorreu mais por um efeito nutricional via aumento no fornecimento de N. Desta forma, faz-se necessário investigar a utilização do extrato de planta isolando-se o efeito da adição de N, para verificar o seu potencial efeito como aditivo modulador da fermentação ruminal.

Palavras-chave: Amônia, Digestibilidade, Metano

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química dos suplementos/substrato microbianos utilizados nos experimentos I (alta forragem) e II (baixa forragem).	21
Tabela 2. Proporção de substrato, aditivo (monensina ou extrato de planta), inóculo ruminal e meio de cultivo usado em cada frasco de 160 mL.....	22
Tabela 3. Efeito da adição do extrato de planta sobre a fermentação ruminal (72 horas) <i>in vitro</i> em dietas com alto teor forragem (experimento I).	23
Tabela 3. Efeito da adição do extrato de planta sobre a fermentação ruminal (72 horas) <i>in vitro</i> em dietas com alto teor forragem (experimento II).	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistema semi-automatico de fermentação ruminal <i>in vitro</i> (Teodourou et al., 1994).	25
Figura 2. Procedimentos do sistema semiautomático	26
Figura 3. Fermentação de aminoácidos segundo reações de Stickland (Russell & Wallace, 1997).	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

AGVs = cidos graxos voláteis

CH₄ = Metano

CO₂ = Gás carbnico

FAO = Food and Agriculture Organization of the United Nations

GEE = Gases do efeito estufa

H₂ = Gás hidrogênio

MS = Matéria seca

N = Nitrogênio

N-NH₃ = Nitrogênio amoniacal

O₂ = Oxignio

PB = Proteína bruta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	5
Extrato de planta como manipulador da fermentação ruminal	8
Resumo	8
1. Introdução.....	9
2. Material e métodos	10
2.1 Local e animais.....	10
2.2 Obtenção do extrato	11
2.3 Dietas/ substratos microbianos do experimento	11
2.4 Ensaio <i>in vitro</i>	11
2.5 Produção e composição dos gases	13
2.6 pH, potencial redox, amônia, AGV, lactato e protozoários ciliados.....	14
2.7 Digestibilidade <i>in vitro</i> -72 horas da matéria seca	15
2.8 Análise estatística	15
3. Resultados	16
3.1 Experimento I (Alto teor de forragem)	16
3.2 Experimento II (Baixo teor de forragem)	16
4. Discussão	17
5. Conclusões.....	18
6. Agradecimentos	19
7. Conflito de interesses	19
8. Referências	19

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, a pecuária mundial de animais ruminantes tem sofrido sobre percepção negativa da sociedade sobre o setor produtivo. Pois por decorrência a fermentação ruminal gerada pelos processos evolutivos de simbiose entre animal hospedeiro e microrganismos ruminais, liberam gases para atmosfera por meio da eructação ruminal dos animais, sendo o CH_4 uma das principais fontes. Cerca de 2 a 12% do total de energia bruta ingerida pelos animais é perdida em forma de CH_4 . Pois o H_2 gerado pela degradação e fermentação dos carboidratos, é incorporado a biossíntese de propionato (ácido graxo volátil produzido no rúmen), lactato, aminoácidos, biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, e seu excesso eliminado principalmente pela síntese de CH_4 (Baker, 1999), contribuindo com cerca de 15% para o aquecimento global (Cotton & Pielke, 1995).

No entanto, durante esse processo fermentativo também acarreta em perdas de N na forma de amônia ruminal, que posteriormente pode ser eliminada pela urina em forma de uréia. Pesquisas indicam, que em rebanhos leiteiros cerca de 20 a 30% do N total consumido se encontram retidos no leite e na carne produzidos, sendo o restante excretado nas fezes e urina (Dou et al., 1996; Kohn et al., 1997; Oenema et al., 2001a). Em sistemas extensivos de gado de corte, a eficiência de uso do N é ainda menor, cerca de 10% (Hutchings et al., 1996).

Todavia, essa perda de energia e N no rúmen, reduz o desempenho da produção animal e também contribui para a ampliação do passivo ambiental gerada pela exploração de ruminantes (Van Soest, 1994).

Nutricionistas de Ruminantes tem desempenhado grandes esforços para melhorar a eficiência alimentar dos animais, por meios da otimização das formulações de dietas e do uso de aditivos moduladores da fermentação ruminal. Sendo que os aditivos mais estudados e utilizados nas ultimas décadas, são os antibióticos ionóforos, principalmente a monensina

sódica. Desde 1976 tem sido utilizada nos Estados Unidos para gado de corte em confinamento e desde 1978 para animais há pasto, porém vem sendo exercida baixa aceitação social pelos países consumidores, banidos pela União Europeia em 2006 os antibióticos ionóforos, alegando-se, poder gerar cepas bacterianas resistentes, colocando a saúde humana em risco. Nasce um grande interesse científico em avaliar alternativas de aditivos moduladores da fermentação ruminal, sem que comprometa a saúde humana e animal.

Neste cenário, os extratos vegetais tem ganhado grande atenção principalmente por apresentarem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (Sivropoulou et al., 1996; Cardozo et al., 2005; Busquet et al., 2006). Essas atividades são atribuídas principalmente pelos compostos secundários biologicamente ativos de plantas (terpenos, fenóis e alcalóides), que bioquimicamente fornecem características de cor, sabor, odor ou como fonte de defesa para ataques de predadores (microrganismos, insetos e herbívoros).

Neste contexto, o grupo de pesquisa em Pecuária de Leite da UFMT/SINOP desenvolveu um extrato de planta com potencial de manipular a fermentação ruminal (em processo de envio de patente pelo Escritório de Inovação Tecnológica da UFMT). Assim, objetivou-se investigar efeitos da adição do extrato de planta sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com alto (90%, base da matéria seca) e baixo teor de forragem (15% base da matéria seca).

A seguir será apresentada uma breve revisão sobre a fermentação ruminal e estratégias de manipulação. O artigo apresentado no capítulo 2 foi escrito em português, porém formatado segundo normas do periódico *Animal Feed Science and Technology*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A fermentação realizada por microrganismos ruminais sobre os componentes dietéticos, resulta principalmente na formação de ácidos graxos voláteis (AGVs), usados pelos ruminantes como fonte de energia e como substratos para síntese de glicose e ácidos graxos de cadeia curta e media, proteína microbiana (principal fonte de aminoácidos essenciais absorvido no intestino delgado), vitaminas do complexo B e vitamina K, gases (CO_2 , H_2 , O_2 e CH_4), amônia, lactato e endotoxinas. O principal objetivo dos nutricionistas de ruminantes sobre a fermentação ruminal é a otimização dos processos desejáveis (digestibilidade dos componentes dietéticos, síntese de proteína microbiana ruminal e produção e composição dos AGVs) e minimizar processos indesejáveis que acarretam em perdas de energia (gases por eructação), nutrientes (amônia) ou danos à saúde dos animais (lactato, amônia e endotoxinas) (Nagaraja et al. 1997; Nagaraja & Titgemeyer, 2008).

A fermentação ruminal, envolve processos oxidativos em condição anaeróbica, gerando co-fatores reduzidos (NADH , NADPH e FADH_2). Para que os processos fermentativos não sejam paralisados, esses co-fatores são re-oxidados (NAD^+ , NADP^+ e FAD^+) por meio de reações de desidrogenação, liberando H_2 no rúmen (Pereira et al., 2011). Neste contexto, para evitar o acúmulo de gás H_2 e conseqüentemente inibir o crescimento microbiano, diversas reações que envolvem hidrogenação são necessárias, as quais se destacam a metanogênese, síntese de aminoácidos, biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, síntese de propionato e síntese de lactato (Russell, 2002).

O metano entérico é derivado da atividade das Archeas metanogênicas ruminais, principalmente pelas *Methanobrevibacter ruminantium* e a *Methanosarcina* sp (McAllister et al, 1996). Encontradas principalmente associadas com protozoários ciliados, as metanogênicas tem afinidade em sintetizar CH_4 a partir de H_2 e CO_2 para gerar suas necessidades energéticas

para seu crescimento (Miller 1995). Diante da função central do H_2 no metabolismo ruminal, as metanogênicas são extremamente importantes para o funcionamento do rúmen e nutrição animal, apesar de responderem por pequena parte da biomassa microbiana (Janssen & Kirs, 2008; Pereira et al., 2011). Para os ruminantes as emissões de CH_4 representam uma perda de até 12% da energia bruta ingerida (Johnson & Johnson, 1995). Desta forma, considerável esforço de pesquisa tem sido direcionado para caracterizar as Archeas metanogênicas do ambiente ruminal e minimizar a produção de gás CH_4 por unidade de produto animal.

A degradação de compostos nitrogenados dietéticos no rúmen, representa um processo essencial para fornecer nitrogênio (amônia e aminoácidos) para o crescimento microbiano e, conseqüentemente, otimizar o fluxo intestinal de proteína microbiana. Toda via, este processo acarreta em perdas de N na forma de amônia no rúmen que posteriormente será destoxificada no fígado, transformada em uréia, que poderá ser reciclada ou excretada pela urina (Lehninger et al., 1995). Paster et al., (1993) identificaram bactérias ruminais restritamente proteolíticas, que promovem proteólise e deaminação de parte da proteína ingerida, como é o caso da *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium aminophilum* e *Clostridium sticklandii*.

A redução de bactérias proteolíticas no rúmen aumenta a taxa de proteína dietética de escape para a digestão no abomaso e absorção no intestino delgado (Chen & Russell, 1991). O uso de aditivos alimentares moduladores da fermentação ruminal, inibem populações microbianas específicas, como às bactérias fermentadoras restritas a aminoácidos (gram positivas) e protozoários, os quais permitem minimizar perdas de N no rúmen.

Os ionóforos são os principais aditivos alimentares utilizados em ruminantes no mundo e que representam um grupo específico de agentes quelatantes, com afinidade por íons monovalentes por meio de ligações poliéster. Os ionóforos inibem bactérias gram positivas, pela catalisação de trocas sódio e potássio ou prótons e potássio há nível de membrana. A monensina sódica (principal ionóforo usado na alimentação animal) inibe bactérias produtoras

de hidrogênio, formato, acetato, butirato, lactato e amônia, enquanto que as produtoras de succinato e propionato e utilizadoras de lactato são resistentes (Russel & Strobel, 1988).

Os efeitos de ionóforos sobre o aumento na eficiência alimentar (cerca de 7%) são atribuídos ao aumento da eficiência energética, pela melhoria da digestibilidade dos alimentos, redução da relação acetato:propionato e redução na produção de metano e lactato no rúmen. Além destes efeitos, um benefício com uso de ionóforos ocorre por meio da inibição da deaminação de aminoácidos por bactérias hiperprodutoras de amônia (Russel & Strobel, 1988).

Entretanto, em razão de evidências de efeitos transitórios dos ionóforos (Pereira et al., 2011) associados com a crescente pressão social em reduzir o uso de antimicrobianos na produção animal. Os extratos vegetais vêm sendo largamente estudados, por poderem gerar efeitos antimicrobianos, antioxidantes e digestivos, destacando-se como substituto aos antibióticos melhoradores de desempenho animal (Rizzo et al., 2010).

Neste contexto, o grupo de pesquisa em Gado de Leite da UFMT/SINOP desenvolveu um extrato de planta com potencial de manipular a fermentação ruminal (em processo envio de patente pelo Escritório de Inovação Tecnológica da UFMT). Assim, objetivou-se investigar efeitos da adição do extrato de planta sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com alto (90%, base da matéria seca) e baixo teor de forragem (15% base da matéria seca).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- BAKER, S.K. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research, v.50, p.1293-1298, 1999.
- BUSQUET, M.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. Plant Extracts In Vitro Rumen Microbial Fermentation. Journal of Dairy Science, Champaign, v. 89, n. 2, p.761-771. 2006.
- CARDOZO, P. W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A. 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.
- COTTON, W.R.; PIELKE, R.A. Human impacts on weather and climate. Cambridge: Cambridge University Press, p.288, 1995
- CHEN, G.C.; RUSSELL, J.B. Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation and deamination by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal Animal Science*, v.69, p.2196-2203, 1991.
- DOU, Z. et al. Managing nitrogen on dairy farms: An integrated approach I. Model description. *Journal of Dairy Science*, v.79, p.2071-2080, 1996.
- JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the archael community of the rumen. *Appl. Environ. Microbiol*, v.74, p.3619-3625, 2008.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*, v.73, p.2483-2492, 1995.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2.ed. São Paulo: SARVIER, p.839, 1995.
- HUTCHINGS, N. J. et al. A model of ammonia volatilization from a grazing livestock farm. *Atmospheric Environmental*, v.30, p.589-599, 1996.
- KOHN, R. A. et al. A sensitivity analysis of nitrogen losses from dairy farms. *Journal of Environmental Management*, v.50, p.417-428, 1997.
- McALLISTER, A.T.; OKINE, E.K.; MATHISON, G.W.; CHENG, K.J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, Ottawa, v.76, p. 231-243, 1996.
- MILLER, T.L. Ecology of methane production and hydrogen sink in the rumen. In: ENGELHARDT, W.V.; LEONHARD-MAREK, S.; BREVES, G.; GIESSECKE, D. (Ed). *Ruminant Physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag, p.317-332, 1995.
- NAGAJARA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.). *The rumen microbial ecosystem*. 2.ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, p.523-632, 1997.
- NAGAJARA, T.G.; TITGEMEYER, E.G. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *Journal of Animal Science*, v.90, p.17-39, 2008.
- OENEMA, J.; KOSKAMP, G. J.; GALAMA, P. J. Guiding commercial pilot farms to bridge the gap between experimental and commercial dairy farms; the project 'Cows & Opportunities'. *Netherlands Journal of Agricultural Science*, v.49, p.277-296, 2001.

- PASTER, B.J.; RUSSELL, J.B.; YANG, C.M.J.; CHOW, J.M.; WOESE, C.R.; TANNER, R. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii*, and *Clostridium aminophilum* sp. nov. Int J Syst Bacteriol, v.43, p.107–110, 1993.
- PEREIRA, L.G.R.; MACHADO, F.S.; CAMPOS, M.M. et al. Avanço conceitual em diagnóstico e estratégias de mitigação de metano entérico em bovinos de leite no Brasil. In: Eds. Marcondes, M. I. et al. (Eds.). Anais do III Simleite. Viçosa-MG, 2011, p.75-122.
- RIZZO, P.V.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C.; TRALDI, A.B.; SILVA, C.S.; PEREIRA, P.W.Z. Extratos vegetais. Revista Brasileira de Zootecnia. Viçosa - MG, v.39, p.801-807, 2010.
- RUSSELL, J.B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition, Ithaca, NY, p.119, 2002.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. Journal of Animal Science, v.66, p.552-558, 1988.
- SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; KOKKONI, S. Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Davis, v. 44, p.1202-1205, 1996.
- VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. New York: Cornell University Press, p.476, 1994.

Extrato de planta como manipulador da fermentação ruminal

Resumo

A monensina é o aditivo mais comumente usado em dietas de ruminantes para manipular a fermentação ruminal, mas em razão da pressão social para reduzir seu uso faz-se necessário investigar aditivos alternativos. O grupo de pesquisa de Pecuária de Leite da UFMT/SINOP desenvolveu um extrato de planta com potencial de manipular a fermentação ruminal (em processo envio de patente pelo Escritório de Inovação Tecnológica da UFMT). Assim, objetivou-se investigar efeitos da adição do extrato de planta sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com alto (90%, base da matéria seca) e baixo teor de forragem (15% base da matéria seca). Para cada condição dietética foi conduzido um ensaio de incubação ruminal *in vitro* em delineamento em blocos casualizados, utilizando um controle negativo (sem aditivo), um controle positivo (monensina sódica na dose de 30 mg/kg matéria seca de substrato; Rumensin® 100, Elanco, EUA) e três doses de extrato de planta (2, 4 e 6 mL/frasco de incubação de 160 mL). Cada unidade experimental foi representada por uma incubação *in vitro* de 72 horas sucessivas por inóculo-animal. Foram utilizados seis repetições por tratamento (três incubações × inóculo de dois animais). O extrato de planta, independente da dose (2, 4 ou 6 mL/500 mg de substrato), aumenta ($P < 0,05$) a digestibilidade *in vitro* da MS em dietas com alto teor de forragem e a produção de CH_4 por unidade de MS digerida, mas não afeta ($P > 0,05$) a produção de AGV e lactato, e a população de protozoários ciliados. Em dietas com baixo teor de forragem o extrato de planta não afeta ($P > 0,05$) a digestibilidade, a produção de AGV e lactato e a população de protozoários ciliados, mas aumenta ($P < 0,05$) a produção de CH_4 . Todavia o estímulo da adição do extrato de planta na fermentação ruminal ocorreu por um efeito nutricional via aumento no fornecimento de N. Desta forma, faz-se necessário investigar a utilização do extrato de planta isolando-se o efeito da adição de N, para verificar o seu potencial efeito como aditivo modulador da fermentação ruminal.

Palavras-chave: Amônia, Digestibilidade, Metano

1. Introdução

Os ruminantes evolutivamente têm mantido uma relação simbiótica com microrganismos ruminais, sendo que os mesmos fornecem nutrientes e condições ideais para o crescimento microbiano e a microbiota recompensa em hidrolisar componentes dietéticos como carboidratos (solúveis insolúveis), proteínas e lipídios dietéticos (Nafikov e Beitz, 2007). Os principais produtos desta atividade microbiana incluem os AGVs, proteína microbiana, amônia, gases (CO_2 , H_2 , O_2 e CH_4). No entanto, alguns desses produtos representam perdas de energia e compostos nitrogenados para o animal hospedeiro, como por exemplo, o gás CH_4 e a amônia ruminal respectivamente. Além disso, o CH_4 está associado aos passivos ambientais, por ser componente dos GEE.

Em função disto, a exploração de ruminantes tem sofrido grande pressão social, segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) a exploração de ruminantes corresponde com cerca de 18% da emissão antropogênica de GEE no mundo, sendo que CH_4 entérico é a principal fonte (O'Mara, 2011). No Brasil os ruminantes têm participado com mais de 95% da emissão de gás CH_4 de origem agrícola (Primavesi et al., 2004).

Os Nutricionistas de Ruminantes vem buscado através da otimização das formulações de dietas e da utilização de aditivos alimentares, produzir dietas metabolicamente mais eficientes com intuito de modificar o ambiente ruminal e melhorar ou inibir populações microbianas específicas. Dentre os aditivos alimentares, os antibióticos ionóforos são os mais utilizados e com bom desempenho em reduzir a produção de metano, amônia amoniacal e de ácido láctico ruminal. Porém o uso de antibióticos na dieta de animais tem tido baixa aceitação social em razão do potencial de gerar cepas bacterianas resistentes.

Por esta razão, há um grande interesse científico em avaliar alternativas que modulem a fermentação ruminal sem que comprometa a saúde animal e humana, onde se destacam os extratos de plantas (Hart et al., 2008).

Diversas plantas contêm compostos secundários (saponinas, taninos, enzimas e óleos essenciais) que as protegem de ataques de fungos, bactérias, insetos e herbívoros. No entanto quando níveis elevados dessas substâncias são ingeridos podem ocorrer efeitos adversos sobre o desempenho e saúde do animal, mas, em baixas concentrações, podem ser capazes de melhorar os processos fermentativos no rúmen (Beauchemin et al., 2008; Pereira et al., 2011).

Neste contexto, o grupo de pesquisa em Pecuária de Leite da UFMT/SINOP desenvolveu um extrato de planta com potencial de manipular a fermentação ruminal (em processo envio de patente pelo Escritório de Inovação Tecnológica da UFMT). Assim, objetivou-se investigar efeitos da adição do extrato de planta sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com 90% e 15% de forragem.

2. Material e métodos

2.1 Local e animais

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Pecuária de Leite da UFMT/Campus Sinop. Foram utilizados dois bovinos fistulados no rúmen (peso corporal de 425 ± 20 kg) e mantidos em uma área de pastagem de 0,50 ha de capim Braquiária *brizantha* cv *Marandú*, contendo cochos para fornecimento das dietas, bebedouros e sombra natural (mais de 100 m²/animal) no Setor de Experimentação em Ruminantes da UFMT/Campus de Sinop.

2.2 Obtenção do extrato

Por razões de proteção intelectual, o processo de obtenção do extrato não pode ser apresentado.

2.3 Dietas/ substratos microbianos do experimento

Os efeitos da adição do extrato de planta sobre a fermentação ruminal foram avaliados em 02 (dois) experimentos sequenciais de fermentação ruminal *in vitro*, sobre diferentes relações forragem:concentrado nas dietas dos animais e substratos microbianos (Exp. 1: 900 g de forragem/kg de MS; Exp. 2: 150 g de forragem/kg de MS; Tabela 1). As dietas e os substratos (mesma composição de ingredientes) foram formulados para conter 12% de proteína bruta (base da MS) a partir dos teores de proteína dos ingredientes previamente analisados. Os ingredientes dos substratos foram pré-secos em estufa de ventilação forçada (55°C) por 72 horas e moídas moinho tipo Wiley em peneira de 1 mm de diâmetro.

Cada experimento teve duração aproximada de 60 dias, sendo 30 dias de adaptação dos animais às dietas e o restante para as três incubações *in vitro*, utilizando-se conteúdo ruminal dos animais adaptados como inóculo. Os animais receberam as dietas duas vezes ao dia, permitindo-se sobras equivalentes a 5% da quantidade ofertada.

2.4 Ensaios *in vitro*

Para cada condição dietética (proporção de forragem e concentrado, Tabela 1) foi conduzido um ensaio de incubação ruminal *in vitro* em delineamento em blocos casualizados, utilizando um controle negativo (sem aditivo), um controle positivo (monensina sódica na dose de 30 mg/kg MS de substrato; Tedeschi et al. 2003; Rumensin® 100, Elanco, EUA) e três doses de extrato de planta (2, 4 e 6 mL/frasco de incubação). Cada unidade experimental

foi representada por uma incubação *in vitro* de 72 horas sucessivas por inóculo-animal. Foram utilizadas seis repetições por tratamento (três incubações × inóculo de dois animais).

Foi implantado a um sistema semiautomático (Teodourou et al., 1994) de fermentação ruminal *in vitro*, em batelada de cultura mista microbiana obtida do conteúdo ruminal (Figura 1). Os frascos de incubação (160 mL) foram mantidos em agitação constante de 72 RPM (NT-155, Novatecnica, Piracicaba, Brasil) em estufa com temperatura de 39°C (TIC-17RGT, Empresa, Full Gange, Brasil). Nos frascos foram adicionados os substratos (Tabela 1), os diferentes aditivos (monensina ou extrato de planta), o meio de cultivo e o inóculo ruminal nas quantidades descritas na Tabela 2.

Foram implantados dois conjuntos de incubação simultâneos, onde cada conjunto utilizou o inóculo de um animal. Cada conjunto conteve 12 frascos de vidro de 160 mL, contendo os cinco tratamentos em duplicata e mais dois frascos de branco (sem substrato). As mensurações do pH, potencial redox, produção e composição dos gases (CH₄ e CO₂) foram realizadas em todos os frascos. Na metade dos frascos (seis; um de cada tratamento e um branco) foram utilizados para avaliar os teores de AGVs, lactato, amônia e protozoários ciliados. A outra metade foi utilizada para avaliar a digestibilidade *in vitro* da MS.

Um dia antes de cada incubação, os substratos (500 mg), os aditivos e o meio de cultivo foram adicionados aos frascos e mantidos em geladeira a 4°C. O meio utilizado foi composto pelas soluções tampão, macro e micromineral, água destilada, cisteína, sulfito de sódio (em substituição ao sulfeto de sódio conforme Rothe e Thomm, 2000) (Tabela 2), e preparado para manter o pH entre 6,8 a 7,0. Os componentes foram adicionados a um recipiente tipo erlenmeyer (1000 mL), aquecidos até a ebulição e mantidos nessa temperatura até a mudança de cor da resazurina de púrpura para rósea, seguido por resfriamento em temperatura ambiente e posteriormente resfriado a 4° C.

O inóculo ruminal dos animais foi coletado duas horas após a alimentação matinal, a partir da mistura homogênea do conteúdo ruminal de diferentes regiões do rúmen. Após a coleta da amostra composta de conteúdo sólido ruminal, a fase líquida foi removida da sólida por sacos de tecido e filtrado em quatro camadas de gaze, acondicionando em garrafa térmica com fechamento hermético e transportado imediatamente para o laboratório. Posteriormente o material foi mantido a 39°C por 10 minutos em repouso em frasco transparente com infusão contínua de CO₂. Após a separação das partículas, o líquido da fase mediana do frasco foi utilizado como inóculo. Em seguida o inóculo foi adicionado aos frascos utilizando seringa e agulha hipodérmica (40 x 12 mm; (18G x 1 ½'')) e mantidos à temperatura de 39°C em incubadora com agitação orbital para fermentação durante 72 horas.

2.5 Produção e composição dos gases

A produção total de gases após 72 horas foi mensurada utilizando sistema semiautomático (Teodourou et al., 1994), usando seringas (20, 40, 60 ml) com agulhas hipodérmicas (25 x 7 mm; 22G x 1'') para coleta do volume de gás, acopladas em uma válvula de três saídas. Uma saída foi acoplada na agulha para inserir no frasco, outra acoplada há uma mangueira ligada em um transdutor de pressão (Modelo DPI 705 Series Digital; Marca GE, Leicester, Inglaterra) para aferir a pressão absoluta, e a terceira acoplada nas seringas para medir o volume e coletar os gases (Figura 2). Após a inserção da agulha no frasco, os gases totais produzidos foram recolhidos por meio da seringa até a pressão atingir o valor zero. Após mensurar o volume de gás, foi retirada uma amostra do gás produzido por meio de tubos Extender® de 20 mL, para a determinação da concentração de CH₄.

As concentrações de gases (CH₄ e CO₂) foram estimadas por meio de cromatografia gasosa (03 CG-FID Agilent Technologies 7820A - CH₄, software de interface EzChrom Elite). O sistema de separação foi constituído de duas colunas: uma HP-Plot/Q 30m x 0,530 mm x

40,0 μm ; a outra HP-Molesieve 30m x 0,530mm x 25,0 μm , utilizando H_2 como gás de arraste a um fluxo de 7mL/min. O sistema de detecção foi constituído por um detector TCD (condições: 200°C aquecimento; 25 mL/min fluxo de referência; 3 mL/min fluxo de complementação(H_2); 10 mL/min coluna+complementação constante) e um detector FID (Condições: 300°C aquecimento; 10 mL/min fluxo H_2 ; 400 mL/min fluxo ar sintético; 25 mL/min fluxo complementação. A temperatura do forno foi mantida a 50°C por um tempo de 4,5 minutos. Pós análise, iniciou-se uma rampa de aquecimento a 60 °C/min. até 250°C. Pós corrida a temperatura foi mantida a 250°C por 2 minutos. A Calibração do cromatógrafo foi realizada com padrões de referência, certificados pela Linde nas concentrações CH_4 (%): 5,05; 10,2; 14,7; 20,1 e CO_2 (%): 20,2; 39,7; 58,3; 79,9.

2.6 pH, potencial redox, amônia, AGV, lactato e protozoários ciliados

Imediatamente após a coleta dos gases, foram mensurados o pH e potencial redox em todos os frascos (HI 2221-Calibration Check pH/ORP Meter, HANNA Instruments, Woonsochet, RI, USA). Na metade dos frascos (conforme descrito item 2.4) foram recolhidas três amostras/frasco: A primeira de 1,5 mL foi transferida para tubo de microcentrífuga de 2 mL contendo 150 μL de ácido tricloroacético (650 mL/L) e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos (3400 Excelsa®Flex, FANEM LTDA, Guarulhos, SP, Brasil). O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e congelado a -20°C, para análise de nitrogênio amoniacal por espectrofotometria usando método do indofenol (Weatherburn, 1967); A segunda amostra de 1,5 mL transferida para tubo de microcentrífuga de 2 mL contendo 300 μL de ácido metafosfórico (300 mL/L) e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e congelado a -20°C, para análise da concentração de ácidos graxos voláteis e ácido láctico; Finalmente a terceira amostra de 2,0 mL de conteúdo do frasco de fermentação foi armazenada em frasco contendo 2 mL de

solução formaldeído (500 ml/L) e congelados a -20 °C para contagem de protozoários conforme técnica de Dehority (1984) com fixação em solução de lugol como descrito por D'Agosto e Carneiro (1999).

As análises de AGVs e lactato foram feitas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Waters Alliance E 2695), com detector PAD 2998 (*photodiode array detector*) e sistema de separação constituído de coluna de fase reversa C18 ODS 80A (150 x 4,6 mm x 5 µm). As condições de análise foram: Fase móvel isocrática constituída de 1 mL/mL de solução aquosa ácida, contendo ácido fosfórico e ajustado pH para 2,35-2,55, temperatura do forno de 30 ± 5 °C, volume de injeção de amostra de 10 microlitros, corrida de 20 minutos e detector com comprimento de onda de excitação em 210 nm. A quantificação foi obtida por curva de calibração com uso de padrões externos.

2.7 Digestibilidade *in vitro*-72 horas da matéria seca

Na outra metade dos frascos (conforme descrito item 2.4), os conteúdos de cada frasco foram filtrados em cadinho filtrante de porosidade dois (previamente secos em estufas 105°C por 24 horas e pesados), lavados com água destilada quente e acetona e secos em estufa a 105°C por 24 horas e posteriormente pesados para determinação da digestibilidade *in vitro* da MS.

2.8 Análise estatística

As variáveis respostas de cada experimento (alto e baixo teor de forragem) foram submetidas à análise de variância segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + b_j + e_{ij}, \text{ sendo:}$$

Y_{ij} = resposta experimental medida referente ao efeito do tratamento i , no animal j ;

μ = constante geral;

T_i = efeito relativo ao tratamento i , onde $i = 1, 2, 3, 4$ e 5 ;

a_j = efeito relativo ao animal/inóculo j , onde $j = 1, 2$; e

e_{ij} = erro aleatório, associado a cada observação, pressuposto NID $(0; \sigma^2)$.

Os efeitos de tratamentos foram decompostos em quatro contrastes ortogonais: efeito de aditivo (controle vs monensina + extrato de planta 2, 4 e 6 mL); efeito de fonte de aditivo (monensina vs extrato de planta 2, 4 e 6 mL); efeito linear da dose de extrato de planta (2, 4 e 6 mL) e efeito quadrático da dose de extrato de planta (2, 4 e 6 mL). Os dados foram apresentados como média dos mínimos quadrados, utilizando nível de 5% de probabilidade para o erro tipo I.

3. Resultados

3.1 Experimento I (*Alto teor de forragem*)

A adição de aditivos, a fonte de aditivo ou a dose do extrato de planta não afetaram ($P > 0,05$) o pH final, potencial redox, a contagem de protozoários ciliados e a concentração de acetato, propionato e butirato no meio após 72 horas de fermentação ruminal *in vitro* (Tabela 3). Porém, a inclusão de aditivos e a fonte de aditivo aumentaram ($P < 0,05$) a concentração de $N-NH_3$, a digestibilidade da MS e consequentemente a produção total de gases, produção total de CH_4 e produção de CH_4 por massa de MS digerida (Tabela 3). A dose do extrato de planta aumentou quadraticamente ($P < 0,05$) a produção de CH_4 por massa de MS digerida, com valor máximo observado na dose de 4 mL do extrato (Tabela 3).

3.2 Experimento II (*Baixo teor de forragem*)

A adição de aditivos, a fonte de aditivo ou a dose do extrato de planta não afetaram ($P > 0,05$) o pH final, potencial redox, a digestibilidade da MS, a contagem de protozoários, e as

concentrações de acetato, propionato, butirato e lactato no meio após 72 horas de fermentação ruminal *in vitro* (Tabela 4). Porém, a inclusão de aditivos e a fonte de aditivo aumentaram ($P < 0,05$) a concentração de $N-NH_3$ e a produção total de gases, produção total de CH_4 e a produção de CH_4 por massa de MS digerida (Tabela 4). A dose do extrato de planta (2, 4 ou 6 mL) afetou ($P < 0,05$) a produção total de gás, a produção de CH_4 e consequentemente a produção de CH_4 por unidade de MS digerida (Tabela 4).

4. Discussão

A adição de extrato de planta, independente da dose, e a substituição da monensina pelo extrato de planta estimula a fermentação ruminal *in vitro*, principalmente por meio do aumento na digestibilidade da MS em dietas com alto teor de forragem. Porém, o aumento na produção total de gases e na produção de CH_4 foi maior que o estímulo na digestibilidade de MS, o que causou o aumento na produção de CH_4 por massa de matéria seca digerida. Por outro lado, a adição de extrato de planta, independente da dose, e a substituição da monensina pelo extrato de planta não afeta o pH, potencial óxido redução, a produção de ácidos graxos voláteis e lactato, e a população total de protozoários ciliados.

Aparentemente e de maneira inesperada, o estímulo da adição do extrato de planta na fermentação ruminal ocorreu por um efeito nutricional, via aumento no fornecimento de N advindo do extrato, sendo o mesmo posteriormente confirmado através da análise de N Kjeldahl. Salienta-se que a concentração de $N-NH_3$ no controle e nos demais tratamentos mantiveram acima dos níveis considerados mínimos de 5 mg $N-NH_3$ /dL, para suportar o crescimento microbiano *in vitro* (Satter and Slyter, 1974). Porém, o extrato de planta continha 7,2 mg de N/mL de extrato, adicionando doses de 14, 30 e 43 mg de N/500 mg de substrato nas doses de 2, 4 e 6 mL de extrato respectivamente. Desta forma, o aumento no suprimento

de N apresenta-se como principal fator responsável pelo estímulo na digestibilidade da MS e na produção de gases.

O maior incremento na produção CH_4 em relação ao estímulo na digestibilidade da MS pode ter ocorrido via aumento da fermentação de compostos nitrogenados (ex. aminoácidos) fornecidos pelo extrato de planta, que por meio de reações do tipo Stickland também produz CH_4 (Figura 3), segundo Russell & Wallace, (1997).

Porém, a adição de extrato de planta estimula menos a fermentação ruminal em relação a dietas com alto teor de forragem. Nestas condições dietéticas, apesar do extrato ter adicionado N ao meio (observado pelo aumento de N-NH_3), não houve estímulo na digestibilidade, apenas na produção total de gases e de CH_4 , o que causou aumento na produção de CH_4 por massa de MS digerida. Pelo menos dois fatores podem ter contribuído para a ausência de estímulo na digestibilidade em dietas com baixo teor de forragem, com o aumento do suprimento de N via extrato: primeiro, os níveis de N-NH_3 no substrato controle foram maiores no experimento com baixo teor de forragem (8,37 mg $\text{N-NH}_3/\text{dL}$; Tabela 4) do que o controle no experimento com alto teor de forragem (6,13 mg $\text{N-NH}_3/\text{dL}$; Tabela 3), o que reduz o impacto da adição de N pelo extrato de planta sobre o crescimento microbiano e a digestibilidade; segundo, o menor teor de FDN da dietas com baixo teor de concentrado (Tabela 1), uma vez que as bactérias fibrolíticas necessitam de maiores concentrações de N-NH_3 para seu crescimento e, portanto, são podem ser mais responsivas ao fornecimento de nitrogênio não proteico (Russell et al., 1992).

5. Conclusões

O extrato de planta, independente da dose (2, 4 ou 6 mL/500 mg de substrato), aumenta a digestibilidade *in vitro* da MS e a produção de CH_4 por unidade de MS digerida em dietas com alto teor de forragem, mas não afeta a produção de AGVs, lactato, e a população

da protozoários ciliados. Em dietas com baixo teor de forragem o extrato de planta não afeta a digestibilidade, a produção de AGVs e lactato, mas aumenta a produção de CH₄.

Todavia o estímulo da adição do extrato de planta na fermentação ruminal ocorre por efeito nutricional via aumento no fornecimento de N. Desta forma, faz-se necessário investigar a utilização do extrato de planta isolando-se o efeito da adição de N para verificar seu potencial efeito como aditivo modulador da fermentação ruminal.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Projetos números 305826/2013-1, 207300/2014-3 e 478274/2012-2) pelo suporte financeiro à pesquisa, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso pelas bolsas de mestrado para João Rafael de Assis e Pâmella Moraes Franco.

7. Conflito de interesses

Não há conflito de interesse.

8. Referências

- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O'Mara, F. & McAllister, T.A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review, *Aust. J. Ex. Agric.* 48, 21-27.
- D'Agosto, M., Carneiro, M.E., 1999. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *R. Bras. Zoologia* 16, 725-729.
- Dehority, B.A., 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Ap. E. Microbiology* 48, 182-185.
- Hart K.J., Yáñez-Ruiz D.R., Duval S.M., McEwan N.R. and Newbold C.J., 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 8-35.

- Nafikov, R.A., Beitz, D.C., 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. *The J. of Nutrition* 137, 702-5.
- O' Mara, F.P., 2011. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 7-15.
- Pereira, L.G.R., Machado, F.S., Campos, M.M., Guimarães R.J., Tomich, T.R., Moreira, E.A., 2011. Avanço conceitual em diagnóstico e estratégias de mitigação de metano entérico em bovinos de leite no Brasil. In: Eds. Marcondes, M. I. et al. (Eds.). *Anais do III Simleite. Viçosa-MG* 75-122.
- Primavesi, O., Frighetto, R.T.S., Pedreira, M.S., 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesq. Agrop. Brasileira* 39, 277-283.
- Rothe, O., Thom, M., 2000. A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic Archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent. *Extremophiles* 4, 247-252.
- Russell, J.B. Wallace, R.J., 1997. Energy yielding the energy consuming reactions. In: Hobson, P.N., Stewar, C.S. *The Rumen Microbial ecosystem*. 2 ed. Blackie Academic & Professional, London.
- Russell, J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G., Van Soest, P.J., Sniffen, C.J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science* 70, 3551-3561.
- Satter, L.D., Slyter, L.L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32, 199-208.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry* 39, 971-974.
- Tedeschi, L.O., Fox, D.G., Tylutki, T.P., 2003. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J. Envir. Quality* 32, 1591-1602.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185-197.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química dos suplementos/substrato microbianos utilizados nos experimentos I (alta forragem) e II (baixa forragem).

Ingredientes	Experimento	
	I	II
Ingredientes (g/kg de matéria seca, MS)		
Feno capim pé-de-galinha (<i>Eleusine indica</i>)	90,00	15,00
Milho grão		73,30
Farelo de soja	9,30	11,00
Mistura Mineral ¹	0,70	0,70
Composição química		
Matéria seca (g/kg)	863.5	878.7
Proteína bruta (g/kg MS)	121.1	127.9
Fibra em detergente neutro (g/kg MS)	596.2	191.3

¹Componentes da mistura mineral: Fosfato bicálcico; calcário; sal comum; flor de enxofre; sulfato de zinco; sulfato de cobre; sulfato de cobalto; sulfato de manganês; iodato de potássio; selenito de sódio. A mistura mineral será calculada para atender 100% das exigências em microminerais.

Tabela 2. Proporção de substrato, aditivo (monensina ou extrato de planta), inóculo ruminal e meio de cultivo usado em cada frasco de 160 mL.

	Controle	Monensina sódica (30 mg/kg substrado)	Extrato de planta (mL)		
			2	4	6
Substrato ¹ , mg de MS	500	500	500	500	500
Monensina sódica ² , mg		0,015			
Extrato de planta, mL			2	4	6
Inoculo ruminal, mL	10	10	10	10	10
Meio ³ , mL	40	40	40	40	40

¹ Conforme Tabela 1;

² Rumensin® 100, 10 g monensina sódica/100 gramas, Elanco, EUA;

³ NH₄HCO₃ 1g/L, NaHCO₃ 8,8 g/L, Na₂HPO₄.H₂O 1,65 g/L, KH₂PO₄ 1,65 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,15 g/L, CaCl₂.2H₂O 0,016 g/L, MnCl₂.4H₂O 0,012 g/L, CoCl₂.6H₂O 0,0013 g/L, FeCl₃ 0,01 g/L, Resarzurina 1,25 mg/L, Cisteína HCl 0,315 g/L, Na₂SO₃ 0,315 g/L.

Tabela 3. Efeito da adição do extrato de planta sobre a fermentação ruminal (72 horas) *in vitro* em dietas com alto teor forragem (experimento I).

Item	Controle	Monensina	Extrato de planta (mL)			EPM	Contrastes (Valor-P) ²			
			2	4	6		1	2	3	4
pH final	7,02	6,95	6,94	6,89	6,96	0,08	0,13	0,67	0,74	0,30
POR, mV ¹	-247	-258	-261	-256	-251	14,1	0,24	0,82	0,31	0,99
Dig. <i>in vitro</i> da MS 72 h (g/kg)	510,00	484,30	574,00	573,00	582,04	41,54	0,03	0,01	0,73	0,80
Protozoários ciliados, log/mL	4,03	4,00	4,07	4,00	4,10	0,20	0,95	0,50	0,83	0,55
Acetato, µmol/mL	24,60	24,70	29,02	26,05	26,30	3,37	0,33	0,24	0,28	0,46
Propionato, µmol/mL	14,80	14,73	16,26	15,01	14,90	1,57	0,72	0,60	0,37	0,66
Butirato, µmol/mL	7,30	8,42	9,00	8,52	7,90	1,40	0,19	0,96	0,34	0,92
Lactato, µmol/mL	0,32	0,26	0,26	0,24	0,35	0,06	0,32	0,64	0,15	0,22
N-NH ₃ , mg/dL	6,13	6,91	8,60	10,10	13,60	1,87	0,01	0,01	0,01	0,50
Produção total gás (72 h), mL	75,03	74,56	86,23	90,73	91,94	12,51	0,01	0,01	0,20	0,67
CH ₄ , % total gás	1,51	1,58	2,61	3,70	3,78	0,70	0,01	0,01	0,01	0,02
CH ₄ total	1,14	1,17	2,25	3,37	3,50	0,72	0,01	0,01	0,01	0,06
mL CH ₄ /mg MS digerida	4,53	4,91	7,82	11,86	11,83	2,60	0,01	0,01	0,01	0,02

¹ POR = potencial oxi-redução.

² 1 = controle vs Monensina + 2, 4 e 6 mL de extrato de planta; 2 = monensina vs 2, 4 e 6 mL de extrato de planta; 3 = efeito linear da dose de extrato de planta; 4 = efeito quadrático da dose de extrato de planta; I

Tabela 4. Efeito da adição do extrato de planta sobre a fermentação ruminal (72 horas) *in vitro* em dietas com alto teor forragem (experimento II).

Item	Controle	Monensina	Extrato de planta (mL)			EPM	Contrastes (Valor-P) ²			
			2	4	6		1	2	3	4
pH final	6,79	6,73	6,73	6,71	6,80	0,17	0,42	0,81	0,36	0,41
POR, mV ¹	-321	-314	-311	-318	-315	38,90	0,23	0,93	0,61	0,40
Dig. <i>in vitro</i> da MS 72 h (g/kg)	689,20	699,40	690,00	752,42	727,20	49,60	0,51	0,54	0,50	0,35
Protozoários ciliados, log/mL	3,90	4,00	3,91	3,96	3,84	0,10	0,60	0,05	0,23	0,10
Acetato, µmol/mL	20,15	21,60	23,33	22,23	23,00	1,74	0,16	0,50	0,83	0,63
Propionato, µmol/mL	19,33	21,50	18,21	18,11	19,53	1,34	0,99	0,07	0,51	0,64
Butirato, µmol/mL	9,83	10,00	10,84	10,00	10,56	2,40	0,60	0,64	0,81	0,34
Lactato, µmol/mL	0,22	0,22	0,11	0,12	0,20	0,10	0,26	0,20	0,30	0,55
N-NH ₃ , mg/dL	8,37	9,14	13,42	13,67	15,36	4,14	0,01	0,01	0,34	0,68
Produção total gás (72 h), mL	117,32	111,00	130,00	132,45	133,15	9,00	0,06	0,01	0,42	0,74
CH ₄ , % total gás	2,10	2,54	4,00	4,54	4,30	0,30	0,01	0,01	0,34	0,20
CH ₄ total	2,35	3,00	4,78	5,70	5,60	0,35	0,01	0,01	0,20	0,20
mL CH ₄ /mg MS digerida	6,51	8,10	12,50	15,50	14,30	1,43	0,01	0,01	0,41	0,34

¹ POR = potencial oxi-redução.

² 1 = controle vs Monensina + 2, 4 e 6 mL de extrato de planta; 2 = monensina vs 2, 4 e 6 mL de extrato de planta; 3 = efeito linear da dose de extrato de planta; 4 = efeito quadrático da dose de extrato de planta.

Figura 1. Sistema semiautomático de fermentação ruminal *in vitro* (Teodourou et al., 1994).

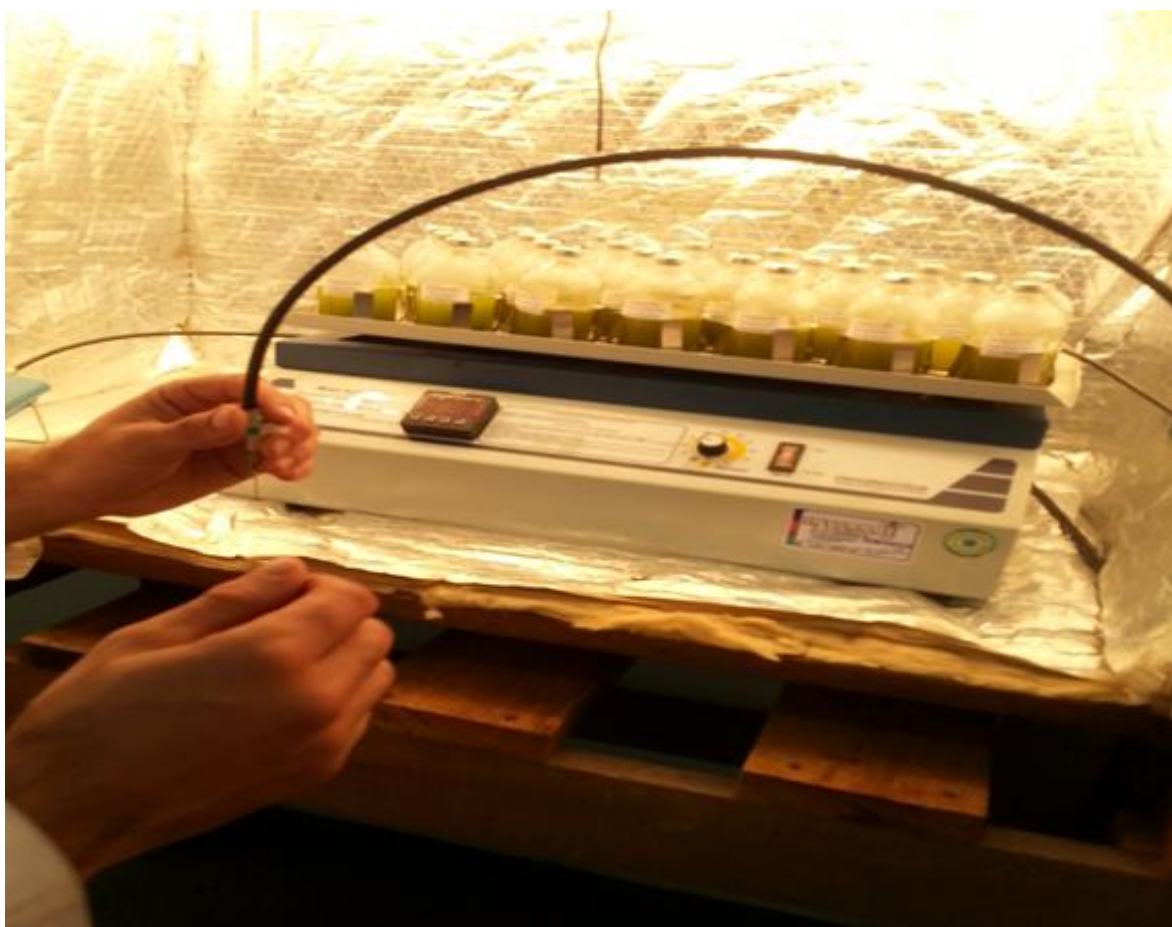


Figura 2. Procedimentos do sistema semiautomático.

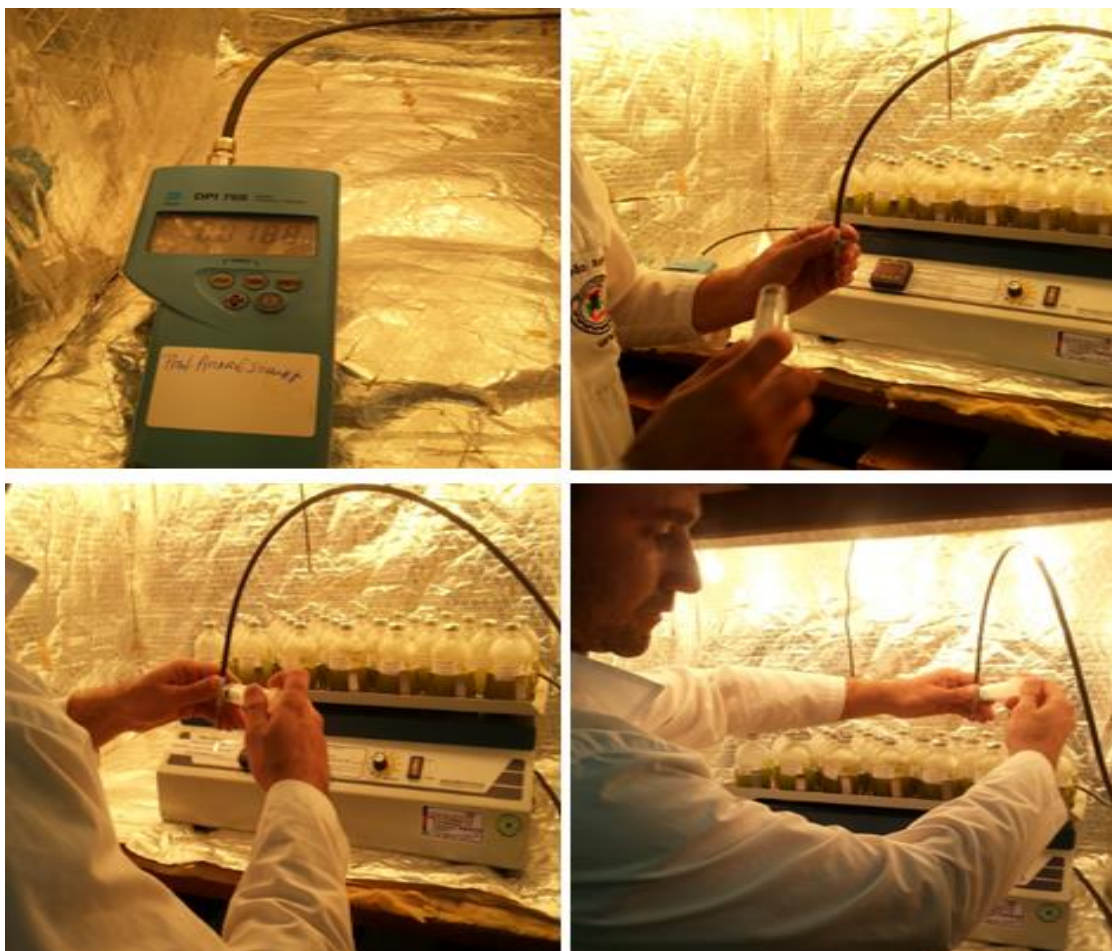


Figura 3. Fermentação de aminoácidos segundo reações de Stickland (Russell & Wallace, 1997).

