

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DISSERTAÇÃO**

**Caracterização do extrato metanólico de *Urochloa humidicola* e seu uso como indutor da fermentação ruminal *in vitro***

**Rafaela Scalise Xavier de Freitas**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE *UROCHLOA  
HUMIDICOLA* E SEU USO COMO INDUTOR DA FERMENTAÇÃO  
RUMINAL *IN VITRO***

**RAFAELA SCALISE XAVIER DE FREITAS**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Elisa Cristina Modesto**

*e Co-orientação dos Pesquisadores*  
**Delci de Deus Nepomuceno**  
**Luiz Gustavo Ribeiro Pereira**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

Seropédica, RJ  
Junho de 2015

599.63

F866c

T

Freitas, Rafaela Scalise Xavier de,  
1987-

Caracterização do extrato metanólico de *Urochloa Humidicola* e seu uso como indutor da fermentação ruminal *in vitro* / Rafaela Scalise Xavier de Freitas - 2015.

67 f.: il.

Orientador: Elisa Cristina Modesto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Zootecnia.

Inclui bibliografia.

1. Ruminante - Alimentação e rações - Teses. 2. Fermentação - Teses. 3. Alimentos - Aditivos - Teses. 4. Metabolismo - Teses. 5. Saponinas - Teses. I. Modesto, Elisa Cristina, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**RAFAELA SCALISE XAVIER DE FREITAS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,  
no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal.

TESE APROVADA EM 26/06/2015



---

Elisa Cristina Modesto Dr<sup>a</sup>. UFRRJ  
(Orientadora)



---

Thierry Ribeiro Tomich Dr. Embrapa-CNPGL



---

João Carlos de Carvalho Almeida Dr. UFRRJ

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Aos meus pais, Tânia e Fernando, por todo o cuidado e amor. A toda minha família e amigos, pelas orações. E ao meu namorado, Sérgio, por estar sempre ao meu lado.

*“Não to mandei eu? Sé forte e corajoso; não temas; nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo por onde quer que andares.”*

***Josué 1: 9.***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus antes de tudo, pela sabedoria e sustento durante todos esses anos.

Aos meus pais, Fernando Alves de Freitas e Tânia Scalise Xavier de Freitas, por sempre investirem nos meus estudos e pelo amor, carinho, por acreditarem em mim e por suas orações.

Ao meu namorado, Sérgio Magalhães Whately, pela ajuda, compreensão, carinho, por sempre estar ao meu lado e acreditar em mim.

Ao meu irmão, Gabriel Scalise Xavier de Freitas.

A todos os meus familiares, que sempre torceram por mim e por todas as orações feitas.

Aos meus amigos, que em todos os momentos estiveram ao meu lado e suas orações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo fornecimento da bolsa de estudo.

À professora e orientadora Elisa Cristina Modesto pela amizade, pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

Aos pesquisadores e coorientadores Delci de Deus Nepomuceno e Luiz Gustavo Ribeiro Pereira pela amizade, orientação, sugestões e pela oportunidade da execução do trabalho.

Ao Thierry Ribeiro Tomich pela orientação, paciência e disponibilidade.

Ao professor Edinaldo da Silva Bezerra pela orientação e pela sua disponibilidade em ajudar.

À discente do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tatiana Pires Pereira pela ajuda na colheita do material e na execução dos experimentos.

Aos bolsistas que ajudaram na colheita do material Marcos Nascimento, Eduardo Sardinha e João Paulo Nascimento Andrade.

À discente do Programa de Pós-Graduação de Química Débora Ramos pela amizade, direção no laboratório e pela ajuda na execução das análises.

Ao PECUS-RumenGases.

Às bolsistas da EMBRAPA GADO DE LEITE Larissa Gomes, Marcela Tavares e Ana Paula Sbardela.

A todos os técnicos de laboratórios da EMBRAPA GADO DE LEITE pelo auxílio durante a execução do experimento.

A todos os professores e funcionários do programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRRJ pelo apoio e convívio ao longo dos dois anos de convivência.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

## RESUMO GERAL

FREITAS, RAFAELA SCALISE XAVIER DE. **Caracterização do extrato metanólico de *Urochloa humidicola* e seu uso como indutor da fermentação ruminal *in vitro***. 2015. 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2015.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos, o primeiro teve por objetivo produzir e caracterizar o extrato metanólico de *Urochloa humidicola*, com o intuito de conhecer as classes de metabólitos secundários presentes e a composição químico-bromatológica. Estes metabólitos possuem diversas funções dentro dos vegetais e estão associados ao sistema de defesa, os protegendo no ambiente que vivem. Estes compostos estão sendo utilizados na alimentação animal por apresentarem propriedades antimicrobianas que podem ser empregadas para induzir a fermentação ruminal. Para este estudo foram realizados os testes de prospecção fitoquímica e as análises de composição bromatológica do extrato metanólico de *U. humidicola* e da *U. humidicola in natura*. Foram identificadas as seguintes classes de compostos secundários: saponinas, taninos, flavonoides, aminoácidos não proteicos, glicosídeos cardioativos, esteróides e tripernóides, catequinas e sacarídeos. O extrato metanólico de *U. humidicola* em relação à planta *in natura*, apresentaram concentrações de proteína bruta de 10,20% e 5,17%, e matéria mineral de 16,14% e 8,14%, extrato etéreo de 35% e 1,51%, carboidrato não fibroso, 9,59% e 39,92%, respectivamente. Esse resultado pode ser explicado pelo método de extração que foi por percolação com metanol, extraíndo somente os constituintes solúveis carregando somente proteína, lipídeos e cinzas para o extrato. No segundo capítulo deste trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de extrato de *U. humidicola* contendo saponina, associada à *Urochloa brizantha*, avaliando a produção de gases (metano e de dióxido de carbono), a cinética ruminal, a degradação da matéria seca e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; acetato, propionato e butirato). Os extratos vegetais de plantas são uma alternativa para induzir a fermentação ruminal por possuírem metabólitos secundários, por serem de fontes naturais e sem riscos de resíduos nos produtos como carne e leite. A indução da fermentação ruminal pode reduzir a produção de metano, aumentar a relação de acetato: propionato e melhorar a degradação do alimento. Foram testados quatro concentrações de extrato metanólico de *U. humidicola* (0, 75, 150 e 250 g/L) sobre a degradabilidade da *U. brizantha* pela produção de gases *in vitro*. Na concentração de 150 g/L do extrato, a produção de gás proveniente dos carboidratos fibrosos, foi de 118,21 mL. No entanto, a maior taxa de degradação dos carboidratos fibrosos ocorreu na concentração 150 g/L. Com o aumento das concentrações de extrato (75, 150 e 250 g/L) os valores da fração solúvel foram de 10,27; 7,46 e 14,07% respectivamente. A degradabilidade ruminal efetiva nas concentrações de (75, 150 e 250 g/L) para as taxas de passagem para um animal em manutenção foram de 38,53%, 27,71% e 20,30%, respectivamente. O aumento das concentrações de extrato exerceu um efeito linear ( $P < 0,05$ ) sobre os valores de pH ruminal, sendo mais evidente na alta concentração de extrato (250 g/L) que foi de 5,73 e 5,43 nos tempos de 12 e 24 horas, respectivamente. As médias de  $CO_2$  com relação à matéria seca incubada e degradada não diferiram entre si com o aumento das concentrações de extrato nos tempos de 12 horas. As médias de metano com base na matéria seca incubada e degradada não apresentaram significância para análise de regressão. O tratamento com a concentração de 250 g/L de extrato apresentou menor valor para metano no tempo de 12 horas. A concentração de extrato (75 g/L) proporcionou um aumento do total de AGCC, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico tanto no tempo de 12 e 24 horas. A adição das diferentes concentrações de extrato metanólico de *U. humidicola* melhorou os parâmetros da cinética da

fermentação da *U. brizantha* nas concentrações de 150 e 250 g/L. Mas causou um efeito negativo sobre a degradação da matéria seca da *U. brizantha* e no pH ruminal com o aumento das concentrações de extrato. Existe uma forte correlação entre os valores de pH e degradação da matéria seca ( $\rho=0,61$ ,  $P<0,05$ ). Aumentou as concentrações de gás carbônico e reduziu a produção de metano. O extrato metanólico bruto de *U. humidicola* tem potencial para uso como indutor da fermentação ruminal. É necessário à purificação e o isolamento da saponina do extrato para comprovar o efeito benéfico sobre a fermentação ruminal. São imprescindíveis novos estudos com o extrato de *U. humidicola*, utilizando animais para se comprovar a eficiência na utilização como aditivo alimentar.

**Palavras-chave:** Aditivos naturais. Metabolismo secundário. Ruminantes.



## OVERVIEW

FREITAS, RAFAELA SCALISE XAVIER DE. **Characterization of the methanol extract of *Urochloa humidicola* and their use as promoter ruminal fermentation in vitro**. 2015. 70p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2015.

This survey was divided into two chapters, the first one producing and characterizing *Urochloa humidicola* methanol extract in order to present secondary metabolites classes and bromathological and chemical composition. These metabolites have several functions within the plant and are associated to defense system, protecting the environment where they have been living. These compounds have been used on animal feed in the reason presenting antimicrobial properties that could be employed for inducing ruminal fermentation. Phytochemical screening tests and chemical composition of *U. humidicola* methanol extract and in natura plant were carried out on this present survey. The following secondary compounds classes: saponins, tannins, flavonoids, non-protein amino acids, cardiotive glycosides, steroids, tripernoids, catechins and saccharides were indentified *U. humidicola* methanol extract in regarding to in natura plant showed 10,20% and 5,17% crude protein concentrations, 35% and 1,51% lipids and 9,59% aand 39,92% non-fibrous carbohydrates, respectively. These results might be explained by percolation with methanol extraction methods extracting only soluble constituents transporting silted protein, lipids and ash to the extract. The second chapter of this survey aimed evaluating *U. humidicola* extract addition effect containing saponin associated to *U. brizantha* assessing gases production, (methane and carbon dioxide), ruminal kinetics, dry matter degradation and short chain fatty acids production (SCFA: acetate, propionate and butyrate), as well. Plant extracts have been an alternative inducing ruminal fermentation by secondary metabolites in the reason they are from natural sources and with no residue hazards in products like meat and milk. Ruminal fermentation induction could reduce methane production, as well as, increase acetate: propionate ratio and improve food degradation. Four *U. humidicola* methanol extract concentrations (0, 75, 150 and 250 g/L) on *U. brizantha* degradability by in vitro gases production were tested. At 150 g/L extract concentration gas production from fibrous carbohydrates was 118,21 mL. However, the highest fiber concentration rate occurred at 150 g/L. Increasing extract concentrations (75, 150 and 250 g/L) soluble fraction values were: 10,27; 7,46 and 14,07%, respectively. Effective ruminal degradability at 75, 150 and 250 g/L concentrations for passage rates for an animal in maintenance were 38,53%, 27,71% and 20,30%, respectively. Extract concentrations increase exerted a linear effect ( $P < 0.05$ ) on ruminal pH values being more evident at high extract concentration (250 g/L) as 5,73 and 5,43 at 12 and 24 hs, respectively. CO<sub>2</sub> averages in regarding to incubated and degraded dry matter did not differ with extract concentrations increase at 12 hs. Methane averages in regarding to incubated and degraded dry matter were no significative by regression analysis. Treatment at 250 g/L concentration presented the lowest value for methane at 12 hs. At 75 g/L concentration, total SCFA (acetic, propionic and butyric acid) increase at 12 and 24 hs was reported. *U. humidicola* methanol extract different concentration addition improved *U. brizantha* fermentation kinects parameters at 150 g/L and 250 g/L concentrations. However, negative effect on *U. brizantha* dry matter degradation and ruminal pH values according to extract concentrations increase was reported. Strong correlation between pH values and dry matter degradation ( $p = 0,61$ ,  $P < 0,05$ ) was presented. Carbon dioxide concentration increased, as well as, methane production decreased *U. humidicola* crude methanol extract presented potential for use as ruminal fermentation promoter. New studies about *U. humidicola* extract

employing animals for justifying its efficiency as food additive should, furthermore, be developed.

**Keyword:** Natural additives. Secondary metabolism. Ruminant.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1 Gênero <i>Urochloa</i> (Braquiária) .....	2
2.2 Metabólitos Especiais.....	3
2.3 Extratos de Plantas na Alimentação Animal .....	5
2.4 Saponina.....	6
2.5 Fermentação Ruminal .....	8
2.6 Produção de Gás <i>in vitro</i> .....	8
2.7 Gases Resultantes da Fermentação Ruminal.....	9
2.8 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs).....	10
<b>3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>UROCHLOA HUMIDICOLA</i></b> .....	<b>19</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>20</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>21</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
2.1 Local.....	23
2.2 Colheita e Processamento do Material .....	23
2.3 Testes de Prospecção Fitoquímica .....	23
2.4 Composição Químico-Bromatológico da <i>Urochloa humidicola</i> e do Extrato Metanólico Bruto da <i>Urochloa humidicola</i> .....	23
2.5 Análise Estatística .....	24
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
3.1 Identificação das Classes de Metabólitos Especiais.....	25
3.2 Composição Bromatológica .....	26
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>28</b>
<b>5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO DE <i>UROCHLOA HUMIDICOLA</i> SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>31</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>32</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>33</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
2.1 Extrato Metanólico da <i>Urochloa humidicola</i> (EmUh).....	35
2.2 Produção de Gases <i>in vitro</i> .....	35
2.3 Degradabilidade <i>in vitro</i> de <i>Urochloa brizantha</i> em Meio Contendo Extrato Metanólico Bruto de <i>Urochloa humidicola</i> .....	36
2.4 Produção de Metano (CH <sub>4</sub> ) e Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> ) <i>in vitro</i> .....	37
2.5 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs) Provenientes da Fermentação da <i>Urochloa brizantha in vitro</i> com Adição do Extrato Metanólico Bruto de <i>Urochloa humidicola</i> .....	37
2.6 Análise Estatística .....	37
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
3.1 Efeito da Adição de Extrato Metanólico Bruto de <i>Urochloa humidicola</i> sobre a Cinética da Produção de Gás e na Degradação da <i>Urochloa brizantha</i> e no pH .....	39
3.2 Produção de Metano (CH <sub>4</sub> ) e Dióxido de Carbono (CO <sub>2</sub> ).....	42
3.3 Ácidos Graxos de Cadeia Curta .....	44
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	<b>46</b>

<b>5 CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>47</b>
<b>6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O aumento da população mundial têm impulsionado maiores produções de alimentos, estimulando a bovinocultura brasileira a atender a demanda nacional e internacional, com o fortalecimento da produção. No entanto, com o aumento da produção, os ruminantes acabam contribuindo com o aquecimento global, pois devido à fermentação ruminal, liberam o metano, o qual é um dos principais gases do efeito estufa (GEE).

O Brasil por possuir o maior rebanho comercial do mundo, também é considerado o maior emissor de metano no ambiente, que pode culminar no futuro como um pretexto para a criação de barreiras não tarifárias a exportação de produtos pecuários brasileiros (PEREIRA, 2013).

Ultimamente tem aumentado o interesse em utilizar recursos naturais para induzir a fermentação ruminal, como no caso de plantas, por conterem metabólitos secundários. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana bem específica e que pode inibir seletivamente certos grupos de microrganismos ruminais. Emprego de plantas ou de extratos de plantas pode ser utilizado como indutor da fermentação ruminal.

Algumas plantas utilizadas na alimentação animal, como as gramíneas e algumas leguminosas, possuem princípios ativos como saponinas, taninos, compostos fenólicos e outras substâncias. A principal fonte de alimentos dos bovinos são as gramíneas forrageiras, com destaque para o gênero *Urochloa* com mais de 100 espécies, as quais bioprodutoras de saponinas e outros metabólitos. A *Urochloa humidicola* é uma espécie bastante utilizada por se adaptar em ambientes úmidos e secos.

Uma forma de avaliar os efeitos que o emprego de extrato metanólico de *U. humidicola* sobre a fermentação ruminal é através da técnica de produção de gases *in vitro*, que são baseados na liberação dos produtos da fermentação e ainda mede os produtos das partes solúvel e insolúvel dos substratos.

Devido ao exposto objetivou-se com este trabalho: a preparação e caracterização do extrato metanólico de *U. humidicola*, a fim de se conhecer as classes de metabólitos secundários presente e a composição químico-bromatológica. Bem como a avaliação do efeito da adição de extrato metanólico bruto de *U. humidicola* contendo saponina, associado a *Urochloa brizantha*, sobre a produção de gases (metano e dióxido de carbono), cinética ruminal, a degradação da matéria seca e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; acetato, propionato e butirato).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Urochloa* (*Braquiária*)

O gênero *Brachiaria* (atualmente denominado *Urochloa*) apresenta cerca de 100 espécies, comumente chamados de braquiárias, estas gramíneas têm origem na África Equatorial e distribuem-se, em especial, nas áreas tropicais (ASSIS et al., 2003). No Brasil, existem mais de 172 milhões de hectares (ha) de pastagem, dos quais aproximadamente 95 milhões de ha são cultivados com braquiárias principalmente, por *Urochloa brizantha* (60 milhões de ha), *Urochloa decumbens* (25 milhões de ha), *Urochloa humidicola* (6 milhões de ha) e outras (4 milhões de ha) (FERRAZ, 2003).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013), o rebanho nacional possui cerca de 211 milhões de bovinos. A maior parte do rebanho nacional tem como principal fonte de alimento as gramíneas forrageiras (REZENDE et al., 2011), em que o gênero *Urochloa* se destaca por possuir uma das principais fontes de nutrientes como: fibras, energia, proteínas, minerais e vitaminas (SILVA & FERRARI, 2012).

As espécies de *Urochloa* são as forrageiras mais importantes nas Regiões Sudeste, Norte e Centro-Oeste por possuírem alta produção de massa, adaptação a diferentes tipos de solos e crescimento durante a maior parte do ano (EUCLIDES, et al., 2010), baixo custo de implantação e manutenção, além de apresentarem como grandes vantagens à propagação por semente, acentuada persistência e rusticidade.

A *U. humidicola* ((Rendle) Morrone & Zuloaga [Syn.*Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick]) é originária do leste e sudeste da África tropical, onde ocorrem naturalmente em áreas relativamente úmidas (BOGDAN, 1977), no Brasil é conhecida popularmente como capim agulha, pontudinho ou quicuío da Amazônia. É pouco exigente quanto ao solo, vegeta bem em locais úmidos ou secos, sendo resistente à geada. A *U. humidicola* têm sido utilizada em grande parte da Amazônia em substituição a *U. decumbens*, que desapareceu em consequência de severos ataques de cigarrinha-das-pastagens na década de 1980 (FONSECA & MARTUSCELLO, 2010) é uma opção bastante empregada no Pantanal, pela sua adaptação a solos encharcados, tolerância (CRISPIM, et al., 2002).

Entretanto o gênero *Urochloa* por produzirem saponinas, são citadas na literatura pelo seu efeito tóxico aos ruminantes e equinos, causando desde uma sensibilidade exacerbada na pele a radiação ultravioleta, seja por ingestão direta de componentes fotossensíveis pré-formados que se acumulam na pele ou por lesão hepática e acúmulo secundário de pigmentos fotossensíveis (Fotossensibilização) (BRUM et al., 2007).

A fotossensibilização apresenta um elevado grau de morbidade (BRUM et al., 2007), mas os casos de letalidade em bovinos em geral é baixo (LE MOS et al., 1996). A fotossensibilização ocasionada por saponina presente em *U. humidicola* pode estar associado ao tipo de saponina encontrado nesta espécie (penogenina e diosgenina), o que segundo Oliveira (2015) é menos patogênica que a saponina protodioscina encontrada nas demais espécies do gênero.

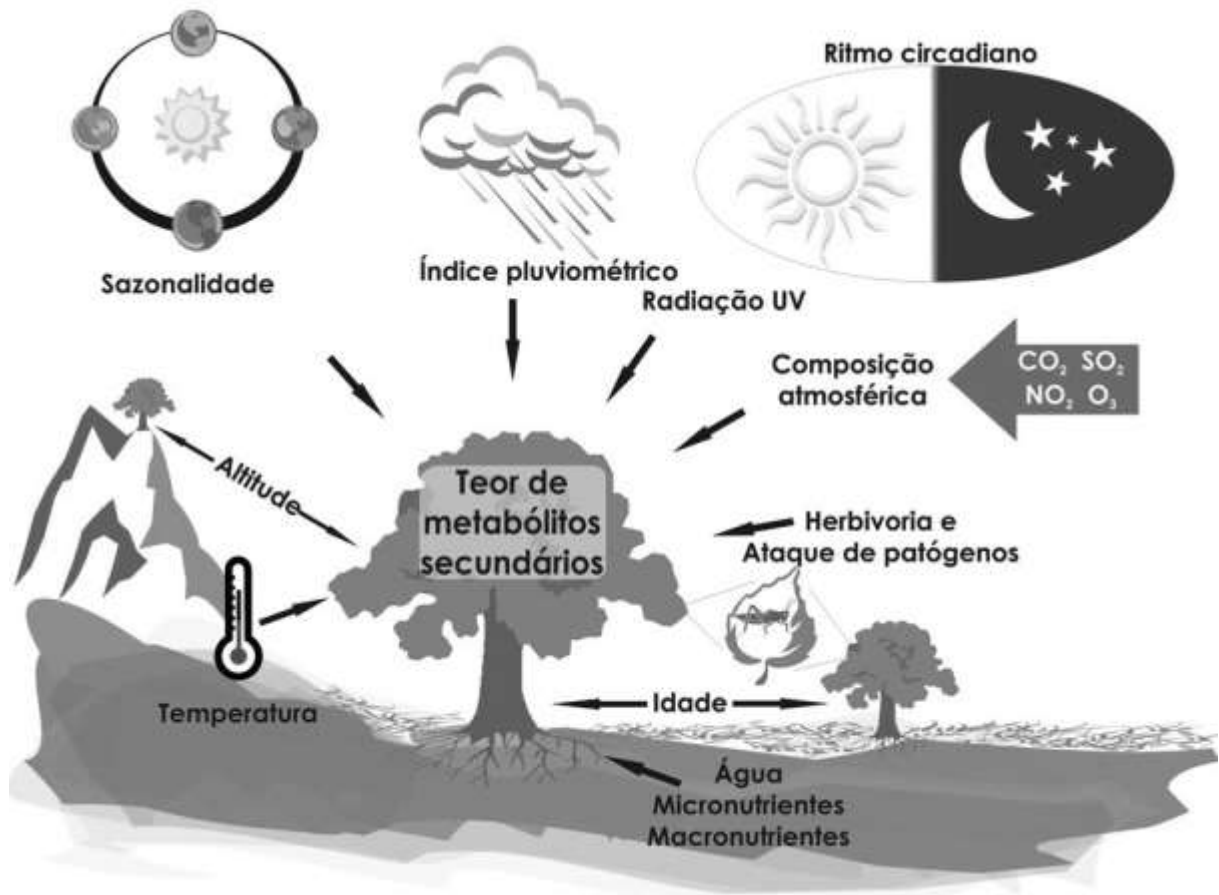
A *U. humidicola* possui em sua composição um conjunto variado de metabólitos especiais (RIBEIRO, 2012) dentre aos quais as saponinas, que são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos que estão relacionadas ao sistema de defesa da planta (WINA et al., 2005a).

## 2.2 Metabólitos Especiais

Os vegetais são organismos sésseis, condição que os impede de ir voluntariamente à busca de alimentos e fuga da presença de predadores (herbívoros). Deste modo, algumas estratégias orgânicas são utilizadas para impedir sua total destruição no ambiente que vivem (LIMA JÚNIOR et al., 2010).

O metabolismo consiste em reações químicas que ocorrem no interior das células (PERES, 2010). Nos vegetais é dividido em primário e secundário ou especial. O primário é responsável pelas funções essenciais à vida dos vegetais, como a produção de compostos (aminoácidos, carboidratos, nucleotídeos e lipídeos) utilizados na fotossíntese e respiração. O metabolismo secundário é responsável pela produção dos compostos orgânicos considerados especiais: alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, aminoácidos não proteicos, glicosídeos cardioativos, compostos fenólicos, sacarídeos e ácidos orgânicos, entre outros. Compostos estes que não estão diretamente envolvidos no crescimento e desenvolvimento das plantas (VERONKA, 2011). Porém, estão associados geralmente ao mecanismo de defesa (BERGAMASCHI, 2010), sendo encontradas em pequenas quantidades, de acordo com o meio que o vegetal se encontra (VERONKA, 2011).

Segundo Raven et al. (2001) ocorrem variações na concentração destes metabólitos e geralmente são sintetizados em uma parte da planta e armazenados em outra. As plantas no ambiente estão constantemente competindo por luz, água e nutrientes com outras espécies (Figura 1). Outros fatores como condições de colheita, estabilização e estocagem também pode interferir no conteúdo e na quantidade final de metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).



**Figura 1.** Principais fatores que podem influenciar os teores de metabólitos secundários. Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Os metabólitos apresentam ampla difusão no reino vegetal, natureza, mecanismo de ação, potencia e efeito variado. E quando ingeridos em altas concentrações, pode acarretar prejuízos ao animal (SANTOS, 2006). Devido à presença de compostos secundários que apresentam sabor amargo, odor desagradável, o que os conferem o efeito antinutricional ou efeito tóxico para os animais (NEPOMUCENO et al., 2013). Embora não exerçam função aparente para o próprio metabolismo vegetal, os animais consomem menos ou rejeitam os vegetais produtores de metabólitos especiais, maximizando o sucesso reprodutivo destas plantas (PERES, 2010).

Metabólitos especiais em forrageiras estão associados a efeitos benéficos na saúde e no desempenho animal (NEPOMUCENO et al., 2013). Assim, podem ser citados com efeitos benéficos das saponinas na modulação da fermentação ruminal, diminuição da população de protozoários e diminuição da produção de metano.

Com a busca de alternativas naturais na alimentação animal, têm se pesquisado cada vez mais a utilização de metabólitos secundários provenientes de extratos de plantas como aditivos. A atuação destes compostos na nutrição de ruminantes possui efeito semelhante a dos antibióticos ionóforos (a sua ação ocorre por meio da seleção ou inibição do crescimento dos microrganismos no rúmen que acarretam mudanças na população microbiana), promovendo a manipulação da fermentação ruminal, seleção e inibição de alguns grupos de microrganismos ruminais, o que ocasiona incremento a produção animal.



## 2.3 Extratos de Plantas na Alimentação Animal

O uso de compostos naturais na alimentação animal tem sido utilizado como potenciais aditivos em substituição ao uso de antibióticos. Em virtude de sua maior aceitação por parte da população, por não apresentar riscos de resíduos nos produtos (BARAKA & ABDL-RAHMAN, 2012). Estes compostos (taninos, alcaloides, terpenos e saponinas entre outros) são provenientes do metabolismo secundário de plantas, possuem como finalidade a proteção do vegetal contra vírus, bactérias e fungos (BERGAMASCHI, 2010).

Na preparação de extratos contendo estes compostos, é adicionado solventes orgânicos com polaridades diferentes cujos procedimentos são direcionados de acordo com a substância que se quer utilizar. Segundo Rizzo *et al.* (2010) estes compostos apresentam propriedades biológicas como agentes antioxidantes, antimicrobiana, anti-alérgicas, anti-inflamatórias.

Os extratos vegetais ricos em saponinas promovem diversas ações no ambiente ruminal: como a redução na produção de amônia, aumento na utilização de nitrogênio da dieta, aumento na eficiência de síntese de proteína microbiana, mudanças no perfil de ácidos graxos de cadeia curta e a redução de produção de metano. Estas mudanças acontecem, pois a saponinas formam complexos com os colesteróis de membrana dos protozoários provocando a lise celular e conseqüentemente a morte (WINA *et al.*, 2005a). Segundo Gebeyehu & Mekasha (2013) a defaunação é a remoção seletiva dos protozoários no rúmen.

No caso das bactérias, Cheeke (1999) observou que as saponinas inibem o crescimento de bactérias gram positivas no rúmen, pois possuem ação parecida com a dos ionóforos, modificando a tensão superficial da matriz extracelular. A utilização do extrato de *Sapindus rarak* (*Lerak ou Klerak*) uma planta nativa do sudeste da Ásia apresentou um consistente efeito antiprotozoário, *in vivo* (THALIB *et al.*, 1996) *in vitro* (NINGRAT *et al.*, 2004) quando incorporado à dieta.

A utilização de altas concentrações (12mg/g) de saponina do *Sapindus saponária* (jequiriti ou ibaró) planta originária da América tropical, reduziu em 54% a contagem de protozoários e em 20% a produção de metano *in vitro* (HESS *et al.*, 2003). Em outro estudo Kamra *et al.* (2008) utilizando extrato de *Sapindus mukorossi* (soapnut) e *Yucca schidigera* (iuca de moxave) ricos em saponinas conseguiram diminuir em 25% a metanogênese *in vitro*, devido a queda acentuada dos protozoários ciliados e das bactérias metanogênicas. Em outros estudos houve a redução próxima a 50% na produção de metano com adição de extratos ricos em saponina (ANANTASOOK *et al.*, 2014).

Patra *et al.* (2012) observaram que baixas doses de saponinas podem melhorar a digestibilidade do alimento, pois estimulam as bactérias celulolíticas e outros tipos de bactérias ruminais e em altas doses, a saponina causam a defaunação e afeta (negativamente ou positivamente) a atividade da fermentação ruminal.

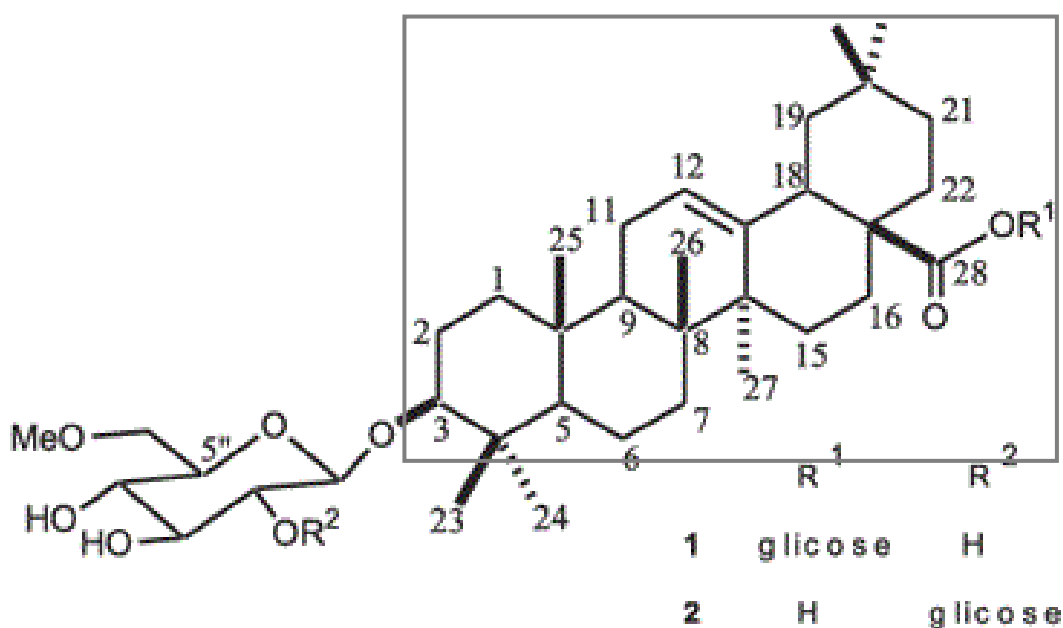
Wina *et al.* (2005b) relataram que adição de baixas doses de extratos contendo saponina na dieta, estimula a produção de ácido propiônico. O que é mais eficiente para o animal, já que a síntese de ácido propiônico libera menos H<sub>2</sub> no sistema e conseqüentemente diminui a produção de metano pelas metanogênicas.

O ácido propiônico é o único capaz de ser convertido em glicose no fígado (gliconeogênese) sendo de extrema importância para os ruminantes principalmente durante a produção de leite e nos últimos estágios do crescimento fetal, por apresentar uma alta demanda energética (LEEK, 2006). De acordo com Nepomuceno (2013) o propionato está relacionado com a antecipação da puberdade, por proporcionar um efeito direto sobre os gonadotrofos que podem o absorver e converte-lo em glicose ou em outros metabólitos relacionados no metabolismo destas células, e ainda está associado ao aumento dos níveis de glicose plasmática em decorrência ao aumento do propionato.

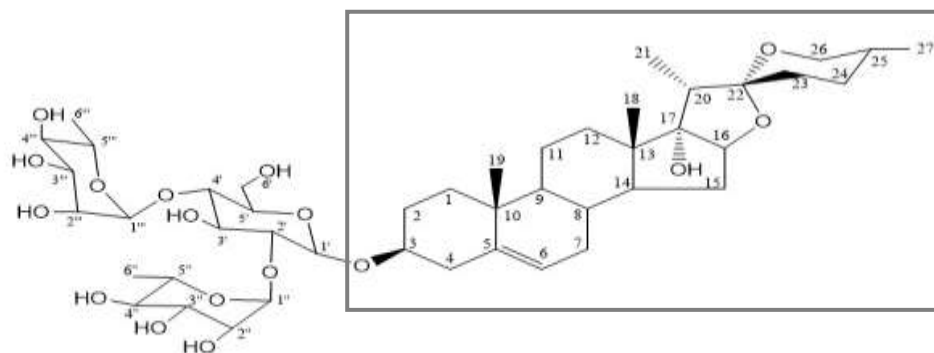
## 2.4 Saponina

As saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundários das plantas, relacionadas com o sistema de defesa. São encontradas nos tecidos (raízes, tubérculos, cascas, folhas, sementes e frutos) que são mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos (HART et al., 2008). As saponinas são amplamente distribuídas no reino vegetal e sendo relatadas em quase 100 famílias de plantas e ainda encontramos aplicações em vários produtos alimentares e formulações médicas (SIROHI et al., 2014).

As saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, este tipo de estrutura possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), que apresenta uma propriedade de reduzir a tensão superficial da água e possui ação detergente e emulsificante. São classificadas em triterpênicas (Figura 1) e esteroidais (Figura 2).



**Figura 2.** Saponina Triterpênica da *Swartzia langsdorffii* (o 3-O-b-D-(6'-metil)-glicopiranosilolean-28-oato de b-glucopiranosila). Em destaque a estrutura triterpênica. Fonte: adaptada de Marqui et al.(2008).



**Figura 3.** Saponina Esteroidal da *Urochloa humidicola* (Penogenina-3-*O*- $\beta$ -D-glicopiranosil-[(2-1)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil]). Em destaque a estrutura esteroidal. Fonte: Adaptado de Oliveira (2015).

As saponinas triterpênicas são encontradas principalmente nas plantas dicotiledôneas, já as esteroidais ocorrem em monocotiledôneas, categoria que as gramíneas pertencem (SCHENKEL et al., 2007).

As saponinas possuem propriedade surfactante, que as confere a capacidade de complexar com o colesterol e esteroides de membranas dos protozoários, que por sua vez causa a lise dos mesmos (WINA et al., 2005a). Este efeito é interessante em produção de ruminantes (SIROHI et al., 2014). Pois a diminuição ou eliminação da população de protozoários do rúmen (defaunação) (WANAPAT et al., 2013) melhora a utilização de nitrogênio (N) da dieta e aumentar o fluxo de proteína microbiana ao intestino (TADESSE, 2014).

A eliminação dos protozoários em ruminantes alimentados com altos teores de grãos pode reduzir a capacidade de absorção do amido, pois estes participam no controle da velocidade de degradação engolfando os grânulos de amido (WANG et al., 2012) que são lentamente liberados quando comparado a liberação pelas bactérias, isso ajuda a limitar a queda do pH ruminal (OLIVEIRA et al., 2007). Entretanto, o excesso de ingestão de amido pelos protozoários pode causar lise da célula e ainda participam na digestão da fibra e celulose (OLIVEIRA et al., 2007).

Belanche et al. (2014) concluíram que apesar das archeas metanogênicas não se acumularem no interior dos protozoários ruminais, entretanto algumas metanogênicas são capazes de se associarem aos protozoários e constituindo uma comunidade com inúmeras particularidades e podem desempenhar um papel chave na metanogênese ruminal.

Segundo Oliveira et al. (2007) a maioria das bactérias presentes no rúmen são *gram* negativas e a população das *gram* positivas pode aumentar de acordo com a elevação de energia na dieta. Cheeke (1999) observou que saponinas conseguem inibir o crescimento de bactérias *gram* positivas da microbiota ruminal, possuindo mecanismos de ação semelhante aos ionóforos, que alteram a tensão superficial na matriz extracelular da bactéria. O que corrobora com Wanapat et al. (2013) que afirmaram que ocorre uma alteração da composição da microbiota ruminal através de uma inibição seletiva ou estímulo ao crescimento de determinadas espécies.

Goel et al. (2008) relataram que a adição de fontes de saponinas sobre cultura microrganismo de líquido ruminal, não afetou a produção de metano e AGCC, mas alterou a microbiota ruminal diminuindo população de protozoários entre 10 a 39% e população de fungos de 20 a 60%, e ocasionou aumento da população de bactérias das espécies *Fibrobacter succinogenes* (21 a 45%) e *Ruminococcus flavefaciens* (23 a 40%). Entretanto, Lila et al.

(2003) observaram que o aumento das concentrações de sarsaponina de 1,2 para 3,2 g/ L resultaram numa redução linear de metano e hidrogênio nos tempos de 12 e 24 horas de incubação.

## 2.5 Fermentação Ruminal

Os ruminantes ao longo do período evolutivo desenvolveram características anatômicas e simbióticas, que permitiram o uso eficiente de carboidratos estruturais como fonte de energia e compostos nitrogenados não proteicos como fonte de proteína. O estômago é dividido em quatro compartimentos sendo: rúmen, retículo e omaso com funções fermentativas que possuem como características um epitélio aglandular, recoberto com epitélio mucoso, com capacidade absorviva e abomaso sendo semelhante ao estômago dos monogástricos, com epitélio glandular (BERCHIELLI et al., 2006).

O rúmen é considerado um ecossistema microbiano único. Seu meio é anaeróbico, com temperatura em torno de 38 a 41 °C, com pH que varia de 6.0 a 7.0 e alberga em seu interior quatro tipos de microrganismos ativos: bactérias, protozoários, fungos e vírus (OLIVEIRA et al., 2007; MILLER et al., 2012). Por abrigar estes microrganismos em seu compartimento, permite que o alimento ingerido seja digerido pelos mesmos (VAN SOEST, 1994).

De acordo com Owens e Goetsch (1988) a fermentação consiste na transformação dos componentes da dieta em ácidos graxos cadeia curta (AGCC), proteína microbiana, vitaminas do complexo B e K, metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Este é o grande sucesso da fermentação microbiana para o animal, pois permite aos ruminantes a utilização de alimentos fibrosos com uma maior eficiência (TADESSE, 2014). Os AGCCs são resultantes finais do processo de fermentação e os principais ácidos são: acético, propiônico e butírico. O ácido propiônico é absorvido pela parede ruminal, levado ao fígado através da corrente sanguínea, onde é metabolizado para ser utilizado pelo animal como fonte de energia (BERCHIELLI et al., 2006). As proporções usuais de AGCCs são de 75% ácido acético, 15% ácido propiônico e 10% ácido butírico (LEEK, 2006).

Durante a fermentação ocorre à produção de gases dentro do rúmen, os que apresentam maior importância são o CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Entretanto, a produção de CO<sub>2</sub> tende a ser duas ou três vezes superior à produção de CH<sub>4</sub>. A produção de metano corresponde em 2 a 12% de perda de energia bruta da dieta durante o processo fermentativo dos carboidratos (LILA et al., 2003), pois as archeas metanogênicas utilizam moléculas importantes para o animal (como o formato e outros ácidos graxos) para a produção de metano (LEEK, 2006). Este processo é responsável por aproximadamente 22% das emissões de CH<sub>4</sub> provenientes de fontes antrópicas, o que equivale a aproximadamente 3,3% do total de gases do efeito estufa (GEE) (USEPA, 2000).

Tadesse (2014) afirmou que a modulação da fermentação ruminal pode reduzir a produção de metano. Fator este, que pode ser conseguido com o uso de concentrado, ácidos orgânicos, ionóforos, processamento de alimentos, aditivos para alimentação animal e microbiano e com o uso de extratos de plantas e seus metabólitos secundários. Estas alternativas podem ser testadas e avaliadas através da técnica de produção de gases *in vitro*.

## 2.6 Produção de Gás *in vitro*

A técnica de produção de gases *in vitro* é realizada através da medição da produção de gás a partir de alimentos incubados com líquido ruminal, refletindo a atividade microbiana

(TAGLIAPIETRA et al., 2010). Durante a fermentação que revela as taxas e extensão em que os componentes são degradados pelos microrganismos do rúmen.

Têm sido bastante empregada, por fornecer informações sobre a cinética da fermentação, degradação da matéria orgânica, nos permite exercer controle experimental e ser de custo relativamente baixo (DIJKSTRA et al., 2005). A mensuração do volume de gás produzido permite a obtenção da curva de degradação (CABRAL et al., 2000).

Podendo ser utilizada para estimar o potencial de produção de metano de diversos alimentos e ainda testar possíveis aditivos para mitigação da produção de metano (BHATTA et al., 2012). E segundo Storm et al. (2012) a quantidade total de gás produzido pela incubação é medida e analisado, para a obtenção dos dados sobre a produção de metano *in vitro*. Ainda é possível determinar a degradação dos alimentos, e determinar se a redução na produção de metano gera um custo à degradação total do alimento.

Uma clara desvantagem da técnica que ela simula somente a fermentação ruminal do alimento e não as emissões e a digestibilidade pelo animal (STORM et al., 2012), além disso, sob condições normais não inclui o período de adaptação dos microrganismos aos alimentos testados. E os resultados obtidos pela produção de gás *in vitro* devem ser interpretados com cuidado, mas é uma técnica bastante útil, como a primeira aproximação para testar diversos alimentos e aditivos ou quando é necessário condições de incubação controladas.

Outro fator importante que pode interferir na fermentação *in vitro* é a composição do líquido ruminal do animal doador (BOGUHN et al., 2013). A degradabilidade ruminal pode ser influenciada pela natureza do alimento e o ambiente ruminal devido à combinação dos ingredientes da dieta (SANTOS et al., 2012).

## 2.7 Gases Resultantes da Fermentação Ruminal

Os principais gases produzidos pela fermentação ruminal são o gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) (60%), metano ( $\text{CH}_4$ ) (30 a 40%), quantidades variáveis de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), traços de sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e oxigênio ( $\text{O}_2$ ) (BERCHIELLI et al., 2006). Os principais (GEE) são o  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$ , o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e os clorofluorcarbonos (CFC's) (LIMA, 2012). Dos quais a agropecuária contribui de forma significativa com a emissão de três deles: metano ( $\text{CH}_4$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (BELEOSOFF, 2013).

O aumento das emissões dos GEE na atmosfera é apontado como uma das principais causas das mudanças climáticas ocorridas nas últimas décadas, promovendo um acréscimo gradual na temperatura global (BELL et al., 2011).

O  $\text{CO}_2$  é o resultado das reações de descabroxilação da fermentação ou da neutralização do íon bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), entrado no rúmen via saliva e  $\text{H}_2\text{S}$  surge da redução dos sulfatos e de aminoácidos contendo enxofre (LEEK, 2006). De acordo com Beleosoff (2013) o  $\text{H}_2$  é um gás liberado, como composto intermediário durante o processo de degradação dos carboidratos estruturais através das bactérias celulolíticas e pelos fungos. O  $\text{H}_2$  não se acumula no rúmen, pois logo é absorvido pelas archeas metanogênicas que o utilizam para reduzir o  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$  (KOZLOSKI, 2009). O metano de origem entérica tem relação direta com a eficiência da fermentação ruminal e desempenho produtivo devido à perda de carbono (BELL et al., 2011).

E além do  $\text{CH}_4$ , outro gás que contribui para o aquecimento global é  $\text{CO}_2$ . Segundo o Intergovernamental Panel on Climate Change (IPCC, 2006) o  $\text{CH}_4$  possui o potencial de aquecimento global 25 vezes maior que o  $\text{CO}_2$  e o tempo de vida na atmosfera de 9 a 15 anos, crescendo a uma taxa de 7,0% ao ano. Segundo Almeida (2010) a atividade agropecuária se

destaca nas emissões de CH<sub>4</sub> provenientes da fermentação entérica e das fezes e as emissões de N<sub>2</sub>O originário das fezes e urinas.

A quantidade de metano produzida durante o processo de fermentação entérica é variável, já que diversos fatores podem influenciar este processo. Zotti e Paulino (2009) observaram que na alimentação animal, o consumo alimentar, a composição da dieta, quantidade de lipídios ingeridos, a digestibilidade do alimento podem interferir no processo fermentativo. Há duas causas principais para a variação de produção de CH<sub>4</sub>: uma é a quantidade de carboidratos fermentados no rúmen e a outra é a proporção de ácido propiônico:acético produzidos (JOHNSON & JOHNSON, 1995).

Kurihara et al. (1999) classificou os alimentos em ordem decrescente de emissão de CH<sub>4</sub> forrageiras tropicais, forrageiras temperadas e dietas concentradas, sucessivamente.

Com o aumento das emissões dos GEE e a preocupação global com o aquecimento tem proporcionado um interesse crescente em todo o mundo em busca da redução de metano (TADESSE, 2014).

Os bovinos são classificados como os maiores poluidores considerando as fontes antrópicas, isto tem ocasionado diversas discussões a respeito de como reduzir as emissões de GEE, e garantir a produção de carne e leite (PATRA & YU, 2014).

As pressões decorrentes para diminuir a produção de GEE impulsionam à busca por menores emissões de CH<sub>4</sub> pelos ruminantes e está agregada à melhora do aproveitamento do alimento ingerido em função da redução das perdas energéticas no ambiente ruminal (BELEOSOFF, 2013).

Entretanto, para verificar a eficiência do processo de mitigação é importante conhecer os inúmeros fatores que afetam o processo de fermentação ruminal. É necessário o uso de estratégias alimentares que minimizem a quantidade de energia perdida na forma de metano, com aumento na produtividade animal e sem danos ao meio ambiente (TADESSE, 2014).

Dentre estas estratégias encontram-se a melhoria da qualidade da dieta, uso de suplementação como lipídios, leveduras, rações peletizadas e mais recente o uso de extratos de plantas ricos em metabólitos secundários, (PATRA & YU, 2014).

## **2.8 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs)**

Os AGCCs (ácido acético, ácido propiônico e o ácido butírico) são produtos provenientes do processo de fermentação ruminal e são absorvidos pela parede ruminal, transportados ao fígado pela corrente sanguínea para serem metabolizados e aproveitados pelo animal com fonte de energia (BELEOSOFF, 2013).

Os microrganismos degradam os nutrientes em AGCC e sintetizam suas proteínas o que são utilizados como fonte de energia e suplemento proteico para os ruminantes, respectivamente (TADESSE, 2014).

O acetato é responsável pela lipogênese no tecido adiposo, o carbono do acetato é incorporado a ácidos graxos tanto pelo tecido adiposo como pela glândula mamária. Os ácido propionato e butirato são metabolizados pelo epitélio ruminal, intestinal e pelo fígado. Sendo que o butirato é grandemente absorvido pelos epitélios ruminais e intestinais, e ainda ser absorvido pela glândula mamária, onde é rapidamente oxidado ou usado na lipogênese. Enquanto, a maior parte do propionato é utilizada na via gliconeogênese, para formação de glicose, Contribuindo com 50% a 75% do requerimento da glicose pelo animal (BERCHIELLI et al., 2006).

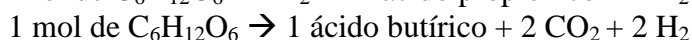
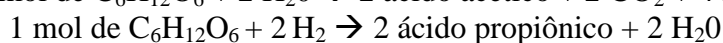
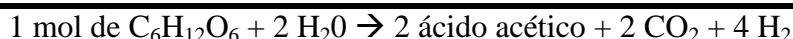
Alterações na concentração de AGCCs são ocasionadas pela suplementação, uso de forragens de boa qualidade (teor PB > 7% e NDT > de 60% em base da matéria seca), adição

de lipídeos e /ou gorduras e indução da fermentação com o uso de aditivos alimentares (BELEOSOFF, 2013).

O perfil de AGCC produzido durante o processo de fermentação está associado com a disponibilidade de H<sub>2</sub> para a produção de CH<sub>4</sub> (BELEOSOFF, 2013). Segundo Wolin (1960) o balanço estequiométrico dos AGCC, para a formação de ácido acético e butírico, favorecem a síntese de metano, enquanto que formação de ácido propiônico reduz a síntese.

A maior produção de ácido propiônico e menor de ácido acético e ácido butírico, produzem uma menor quantidade de H<sub>2</sub> e, conseqüentemente menor produção de CH<sub>4</sub> (NAVARRO-VILLA et al., 2011), além de ser a única reação que não produz CO<sub>2</sub> (GUIMARÃES JÚNIOR et al., 2008).

As reações de fermentação de hexoses da parede celular segundo Hungate (1966):



Uma alternativa para a redução ou o desvio da produção do metano é através da indução da fermentação ruminal, que pode ser pelo uso de dietas que propiciem uma relação acetato: propionato menor ou através da ação direta sobre os microrganismos metanogênicos e/ou os produtores de H<sub>2</sub>, como protozoários, fungos e principalmente as bactérias celulolíticas (LONGO, 2007).

### 3 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, M. H. S. P. **Análise econômico-ambiental da intensificação da pecuária de corte no Centro-Oeste brasileiro**. 2010. 86p. Dissertação (Mestrado). ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.

ANANTASOOK, N.; WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Manipulation of ruminal fermentation and methane production by supplementation of rain tree pod meal containing tannins and saponins in growing dairy steers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 1, p. 50-55, 2014.

ASSIS, G. M. L.; EUCLYDES, R. F.; CRUZ, C. D.; VALLE, C. B. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

BARAKA, T. A. M.; ABDUL-RAHMAN, M. *In vitro* evaluation of sheep rumen fermentation pattern after adding different levels of eugenol – fumaric acid combinations. **Veterinary World**, v. 5, n. 2, p. 110-117, 2012.

BELANCHE, A.; FUENTE, G. L.; NEWBOLD, C. J. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 3, p. 663–677, 2014.

BELEOSOFF, B. S. **Potencial de produção de gases totais e metano *in vitro* de pastagens de *panicum maximum* jacq. cv. tanzânia submetida a diferentes manejos de pastejo**. 2013. 145 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BELL, M. J.; WALL, E.; SIMM, G.; RUSSEL, G. Effects of genetic line and feeding system on methane from dairy systems. **Animal Feed Science Technology**, v. 166-167, n. 1, p. 699-707, 2011.

BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, p.583, 2006.

BERGAMASCHI, K. B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.

BHATTA, R.; SARAVANAN, M.; BARUAH, L.; SAMPATH, K. T. Nutrient content, *in vitro* ruminal fermentation characteristics and methane reduction potential of tropical tannin-containing leaves. **Journal of Science of food and Agriculture**, v. 92, n. 15, p. 2929-2935, 2012.

BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants: grass and legume**. London and New York, 475p. 1977.



BOGUHN, J.; ZUBER, T.; RODEHUTSCORD, M. Effect of donor animals and their diet on in vitro nutrient degradation and microbial protein synthesis using grass and corn silages. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, n. 3, p. 547-557, 2013.

BRUM, K. B., HARAGUCHI, M.; LEMOS, R. A. A., RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M. C. S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2007.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; MALAFAIA, P. A. M.; LANA, R. P.; SILVA, J. F. C.; VIEIRA, R. A. M.; PEREIRA, E. S. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimativas pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2087-2098, 2000.

CHEEKE, P. R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. In: **American Society of Animal Science**. Indianapolis, Proceedings... Indianapolis: ASAS, p.1-10, 1999.

CRISPIM, S. M. A., BRANCO, O. D. **Aspectos Gerais das Braquiárias e suas Características na Sub-Região da Nhecolândia**, Pantanal, MS. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, p. 25. (EMBRAPA-CPAP). Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33), 2002.

DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; BANNINK, A.; FRANCE, J.; LÓPEZ, S. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124, part. 1, p. 561-578, 2005.

EUCLIDES, V. P. B.; VALLE, C. B.; MACEDO, M. C. M., ALMEIDA, R. G.; MONTAGNER, D. B.; BARBOSA, R. A. Brazilian scientific progress in pasture research during the first decade of XXI century. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, (supl. especial), p. 151-168, 2010.

FERRAZ, F. M. Pastagens garantem o futuro da agropecuária brasileira. In: NAKAMAE, I.J. (Ed.) **Anualpec – Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Agroinformativos, 10 ed., p. 55-56, 2003.

FONSECA, M. D.; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas Forrageiras**. Viçosa-MG, 1 ed., p. 43, 2010.

GEBEYEHU, A.; MEKASHA, Y. Defaunation: effects on feed intake, digestion, rumen metabolism and weight gain. **Wudpecker Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 5, p. 134-141, 2013.

GUIMARÃES JR, R.; CABRAL FILHO, S. L. S.; FERNANDES, F. D.; VILELA, L.; MARTHA JR, G. B. **Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na Embrapa Cerrados**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p.8 (Comunicado Técnico, 144 – Embrapa), 2008.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo do metabolismo secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

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**, v. 105, n. 3, p. 770-777, 2008.

HART, K. J.; YÁNEZ-RUIZ, D. R.; DUVAL, S. M.; MCEWAN, N. R. NEWBOLD, C. J. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 147, n. 1-3, p. 8–35, 2008.

HESS, H. D., MONSALVE, L. M., LASCANO, C. E., CARULLA, J. E., D'IAZ, T. E., KREUZER, M. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and Sapindus saponaria fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. **Australian Journal Agricultural Research**, v. 54, n. 7, p. 703–713, 2003.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. New York: Academic Press, 533 p, 1966.

IBGE. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2013. **Produção Pecuária Municipal**, Rio de Janeiro, v. 41, p.1-100, 2013.

IPCC - INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Emissions from livestock and manure management**. In: EGGLESTON HS, BUENDIA L, MIWA K, NGARA T, TABANE K. Editors. IPCC Guidelines for national greenhouse gas inventories. Hayama: IGES, v. 10, p. 747-846, 2006.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane Emissions from Cattle. **Journal Animal Science**, v. 73, n. 8, p. 2483- 2492, 1995.

KAMRA, D. N.; PATRA A. K.; CHATTERJEE, P. N.; KUMAR, R.; AGARWAL, N.; CHAUDHARY, L. C. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. **Australian Journal Experimental Agriculture**, v. 48, n. 2, p. 175-178, 2008.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2 ed., Santa Maria: Universidade Federal Santa Maria. p. 216, 2009.

KURIHARA, M.; MAGNER, T.; HUNTER, R. A. MCCRABB, H. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 3, p. 227-234, 1999.

LEEK, B. F. Digestão no estômago dos ruminantes. In: SWENSON, M.J.; REECE, O.W. **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.353-380, 2006.

LEMOS, R. A. A.; FERREIRA, L. C. L.; SILVA, S. M; NAKAZATO, L.; SALVADOR, S. C. Fotossensibilização e colangiopatia associada a cristais em ovinos em pastagens com Brachiaria decumbens. **Ciência Rural**, v. 26, n. 1, p. 109-113, 1996.

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 Dairy Science**, v. 86, n. 10, p. 3330-3336, 2003.

LIMA, A. P. **Produção de gases de efeito estufa e potencial de geração de créditos de carbono em processos de esgoto sanitário**. 2012. 124p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2012.

LIMA JÚNIOR, D. M.; MONTEIRO, P. B. S.; RANGEL, A. H. N.; MACIEL, M. V.; OLIVEIRA, J. E. O.; FREIRE, D. A. Fatores antinutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 4, p. 132-143, 2010.

LONGO, C. **Avaliação in vitro de leguminosas taniníferas tropicais para a mitigação do metano entérico**. 2007. 153p. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2007.

MARQUI, S. R.; LEMOS, R. B.; SANTOS, L. A.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. Saponinas antifúngicas de *Swartzia langsdorffii*. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 828-831, 2008.

MILLER, M. E. B.; YEOMAN, C. J.; CHIA, N.; TRINGE, S. G.; ANGLY, F. E.; EDWARDS, R. A.; FLINT, H. J.; LAMED, R.; BAYER, E. A.; WHITE, B. A. Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by a metagenomic survey of the rumen microbiome. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 207-227, 2012.

NAVARRO-VILLA, A.; O'BRIEN, M.; LÓPEZ, S.; BOLAND, T. M.; O'KIELY, P. Modifications of a gas production technique for assessing in vitro rumen methane production from feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, n. 1, p. 163-174, 2011.

NEPOMUCENO, D. D. **Efeitos do manejo nutricional sobre a maturação do eixo reprodutivo somatotrófico no início da puberdade de novilhas Nelore**. 2013. 138p. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ-USP, Piracicaba, SP, 2013.

NEPOMUCENO, D. D.; ALMEIDA, J. C. C.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, R. D.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A. Classes of secondary metabolites identified in three legume species. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 10, p. 700-705, 2013.

NINGRAT, R. W. S. **Studies on sapindus rarak dc as a defaunating agent and its effects on rumen fermentation**. 2004. 125p. Thesis (Doctor of Philosophy), The University of Nottingham Sutton Bonington, Leicestershire, United Kingdom, 2004.

OLIVEIRA, D. R. **Metabólitos especiais isolados de raízes e folhas de *Brachiaria humidicola***. 2015. 114p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 2, p. 1-13, 2007.

OLIVEIRA, L. R.; BARBOSA, F. A. M. **Bovincultura de corte: desafios e tecnologias**. Salvador: EDUFBA, 2007.

OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. **Ruminal fermentation**. In: CHURCH, D.C. (Ed) the ruminant animal: digestive physiology and nutrition. Waveland Press. p. 145-171, 1988.

PATRA, A. K.; STIVERSON, J.; YU, Z. Effects of quillaja and yucca saponins on communities and select populations of rumen bacteria and archaea, and fermentation in vitro. **Journal Applied Microbiology**, v. 113, n. 13, p. 29-40, 2012.

PATRA, A. K.; YU, Z. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. **Applied Microbiol Biotechnology**, v. 98, n. 2, p. 897-905, 2014.

PEREIRA, L. G. R. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 26, n. 1, p. 264-277, 2013.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, 2010. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>. Acesso em: 09/04/2014.

RAVEN, P. H, EICKHORN, S. E. & EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Editora: Guanabara Koogan S.A, Rio de Janeiro. 906p, 2001.

REZENDE, P. L. P.; RESTLE, J.; FERNANDES, J. J. R.; PÁDUA, J. T.; FREITAS NETO, M. D.; ROCHA, F. M. Desempenho e desenvolvimento corporal de bovinos leiteiros mestiços submetidos a níveis de suplementação em pastagem de *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1453-14558, 2011.

RIBEIRO, R. C. **Considerações sobre a química de *Brachiaria humidicola* e efeitos alelopáticos sobre leguminosas tropicais**. 2012. 105p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

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**, v. 39, n. 4, p. 801 - 807, 2010.

SANTOS, M. A. T. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócolis, couve-flor e couve. **Ciências Agrotécnicas**, v. 30, n. 2, p. 294-301, 2006.

SANTOS, V. C.; EZEQUIEL, J. M. B.; MORGADO, E. S.; HOMEM JÚNIOR, A. C.; FÁVARO, V. R.; AUREA, A. P. D.; SOUZA, S. F.; BARBOSA, J. C. Influência de subprodutos de oleaginosas sobre parâmetros ruminais e a degradação da matéria seca e da proteína bruta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1284-1291, 2012.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, p. 711-740, 2007.

SILVA, S. F.; FERRARI, J. F. Descrição botânica, distribuição geográfica e potencialidades de uso da *Brachiaria brizantha* (hochst. ex. a. rich) stapf. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v. 8, n. 14; p. 302-314, 2012.

SIROHI, S. K.; GOEL, N.; SINGH, N. Utilization of saponins, a plant secondary metabolite in enteric methane mitigation and rumen modulation. **Annual Research & Review in Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2014.

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

TADESSE, G. Rumen manipulation for enhanced feed utilization and improved productivity performance of ruminants: a review. **Momona Ethiopian Journal of Science**, v. 6, n. 2, p. 3-17, 2014.

TAGLIAPIETRA, F.; CATTANI, M.; BAILONI, L.; SCHAIIVON, S. *In vitro* rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 3, p.197-201, 2010.

THALIB, A.; WIDIAWATI, Y.; HAMID, H.; SUHERMAN, D.; SABRANI, M. The effects of saponin from *Sapindus rarak* fruit on rumen microbes and performance of sheep. **Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner**, v. 2, n. 1, p. 17-20, 1996.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **Evaluating ruminant livestock efficiency projects and programs**. In: Peer Review Draft. Washington, D.C.: Office of Policy, Planning and Evaluation. p. 48, 2000.

VAN SOEST, P. J. **Nutricional ecology of the ruminant**. 2 ed., Ithaca: Cornell Press/Constock Publish. p.476, 1994.

VERONKA, D. A. **Alelopatia do extrato bruto de *Brachiaria decumbens* na germinação e vigor de sementes e no vigor de plântulas de *Brachiaria brizantha***. 2011. 36p. Dissertação (Mestrado profissional em produção e gestão agroindustrial). Universidade Anhanguera – UNIDERP, Campo Grande, MS, 2011.

WANAPAT, M.; KANG, S.; POLYORACH, S. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 32, p. 1-11, 2013.

WANG, J. K.; YE, J. A.; LIU, J. X. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. **Tropical Animal Healtyh Production**, v. 44, n. 4, p. 697-706, 2012.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponincontaining plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005a.

WINA, E.; MUETZEL, S.; HOFFMAN, E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial

activity and microbial community structure in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, v. 121, n. 1-2, p. 159-174, 2005b.

WOLIN, M. J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of dairy science**, v. 43, p. 1452-1459, 1960.

ZOTTI, C. A.; PAULINO, V. T. **Metano na produção animal: Emissão e minimização de seu impacto**. 2009. Disponível em: <<http://www.iz.sp.gov.br/pdfs/1259324182.pdf>> Acesso em: 14/04/2015.

## **CAPÍTULO I**

### **PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO DE *UROCHLOA HUMIDICOLA***

## RESUMO

Metabólitos secundários possuem diversas funções dentro dos vegetais e estão associados ao sistema de defesa, os protegendo no ambiente que vivem. Estes compostos estão sendo utilizados na alimentação animal por apresentarem propriedades antimicrobianas que podem ser empregadas para a indução da fermentação ruminal. Assim objetivou-se neste trabalho preparar e caracterizar o extrato metanólico de *Urochloa humidicola*, como intuito de identificar as classes de metabólitos secundários presentes e a composição químico-bromatológica. A *Urochloa humidicola* foi seco a sombra por sete dias e moídas em moinho tipo Willey em partículas de 2 mm. O material foi extraído através de maceração com metanol em temperatura ambiente até a exaustão. Para este estudo foi realizado os testes de prospecção fitoquímica e as análises de composição bromatológica do extrato metanólico de *U. humidicola* e da *U. humidicola in natura*. Foram identificadas as seguintes classes de compostos secundários: saponinas, taninos, flavonoides, aminoácidos não proteicos, glicosídeos cardioativos, esteróides e tripernóides, catequinas e sacarídeos. O extrato metanólico bruto de *U. humidicola* possui uma ampla gama de metabólitos secundários em sua composição, tendo uma maior concentração de saponina. O extrato metanólico de *U. humidicola* em relação à planta *in natura*, apresentaram concentrações de proteína bruta de 10,20% e 5,17%, e matéria mineral de 16,14% e 8,14%, extrato etéreo de 35% e 1,51%, carboidrato não fibroso, 9,59% e 39,92%, respectivamente. Esse resultado pode ser explicado pelo método de extração que foi por maceração a frio com metanol, extraíndo somente os constituintes solúveis carregando somente proteína, lipídeos e cinzas para o extrato. O extrato metanólico de *Urochloa humidicola* apresenta características que permitem seu uso como aditivo natural ou fitogênico por apresentar diversos metabólitos secundários que podem induzir a fermentação ruminal. A técnica de extração do extrato metanólico disponibiliza todos os constituintes solúveis o que propicia o uso do extrato como aditivo nutracêutico. São necessários maiores estudos de quantificação e caracterização da atividade dos metabólitos secundários presentes e com animais para sugerir o emprego do extrato metanólico bruto na alimentação animal.

**Palavras-chave:** Extrato de plantas. Metabólitos especiais. Nutritivo.



## ABSTRACT

Secondary metabolites present several functions within the plant and are associated to defense system protecting the environment where they have been living. These compounds have been used on animal feeding in the reason presenting antimicrobial properties that might be employed for inducing ruminal fermentation. This survey aimed preparing and characterization *Urochloa humidicola* methanol extract, as well as, identifying secondary metabolites classes and bromathological and chemical composition *U. humidicola* was dried at shade for seven days and crushed on 2 mm particles in a Willey mill. The material was extracted by maceration with methanol until exhaustion. For this survey phytochemical screening tests and bromathological and chemical composition analyses of the *U. humidicola* methanol extract, as well as, in natura plant. Following compounds classes: saponins, tannins, flavonoids, steroids, tripernoids, non-protein amino acids, cardioactive glycosides, catechins and saccharides were identified. *U. humidicola* crude methanol extract presents a wide variety of secondary metabolites on its composition, with the highest saponin concentration. *U. humidicola* methanol extract in regarding to nature plant presented 10,20% and 5,17% crude protein, 16,14% and 8,14% mineral matter, 35% and 1,51% lipids and 9,59% and 39,92% non-fibrous carbohydrates concentrations. These results might be explained by cold maceration with methanol method only extracting soluble constituents transporting silted protein, lipids and ash to the extract. *U. humidicola* methanol extract presents traits allowing its use as natural or phytogenic additive due to its several secondary metabolites inducing ruminal fermentation methanol extract extraction technique provides all the solubles constituents supplying extract use as nutraceutical additive. Furthermore, some more studies about secondary metabolites activity quantification and characterization employing animals for suggesting crude methanol extract employment on animal feeding must be carried out.

**Keywords:** Plant extract. Special metabolites. Nutritive.

## 1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional mundial requer uma maior produção de alimentos determinando uma maior demanda por produtos agrícolas (WANAPAT et al., 2013). A pecuária brasileira com intuito de atender as demandas nacional e internacional tem investido no aumento da produção e em biotecnologias para consolidar o Brasil como o principal exportador de produtos cárneos, o que tem ocasionado aumento do número de estudos com produtos naturais para utilização na alimentação animal, como alimentos nutracêuticos ou aditivos fitogênicos.

Extratos de plantas são ricos em metabólitos secundários. Estes compostos apresentam diversas funções, dentre qual a defesa química dos vegetais (SLIWINSKI et al., 2002). Alguns metabólitos possuem funções específicas dentro dos vegetais, como proteção contra herbívoros e infecção por microrganismos patogênicos (NEPOMUCENO et al., 2013) atribuindo propriedade antimicrobiana, permitindo a sua utilização como indutor da fermentação ruminal pela inibição seletiva de grupos de microrganismos ruminantes de interesse zootécnico (KAMRA et al., 2006).

Santra et al. (2012) afirmaram que os metabólitos secundários de plantas possuem potencial para induzir a fermentação ruminal e conseqüentemente mitigar a produção de metano. Wanapat et al. (2013) utilizaram extratos de plantas contendo taninos condensados e saponinas como aditivos na alimentação de ruminantes com esse mesmo propósito, em oposição a aditivos ionóforos.

Os extratos das plantas: alho (*Allium sativum*), pimentão (*Capsicum annuum*), canela (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), erva doce (*Pimpinella anisum*) tem sido testados como indutores da fermentação ruminal *in vitro* para bovinos de corte alimentados com alta quantidade de concentrado (CARDOZO et al., 2005), porém por serem utilizados como alimentos humanos podem gerar conflitos relacionados com o aumento de preços destes produtos.

As gramíneas e leguminosas forrageiras possuem princípios ativos como saponinas, taninos, compostos fenólicos entre outros (SIROHI et al., 2014) propiciando o uso da própria forragem como meio de alterar a fermentação ruminal bastando para isto extrair e concentrar os metabólitos. A *Urochloa humidicola* possui saponina (BARBOSA et al., 2006) a qual possui efeito sobre microrganismos, favorecendo seu emprego na alimentação de ruminantes, visando alterar o padrão fermentativo.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção e caracterização do extrato metanólico de *U. humidicola*, a fim de se conhecer as classes de metabólitos secundários presentes e sua composição químico-bromatológica.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química, no Instituto de Ciências Exatas e no Laboratório de Bromatologia dos Alimentos, no Instituto de Zootecnia localizados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

O material vegetal de *Urochloa humidicola*, com idade de 4 meses foi colheitada em uma pastagem já estabelecida, localizada no Setor de Caprinocultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Latitude: 22°46'59'' S, Longitude: 43°40'45'' W e altitude de 33 m). O solo da área experimental foi classificado como sendo Planossolo Háplico (EMBRAPA, 1999). O clima da região é caracterizado como quente e úmido no verão, sem invernos pronunciados, e muito secos. Este tipo climático se enquadra no tipo Aw segundo classificação de Köppen.

### 2.2 Colheita e Processamento do Material

O corte do material vegetal foi realizado no dia 28 de outubro de 2013, onde foi selecionada a parte aérea da planta a 0,05 m acima da superfície do solo. A *U. humidicola* foi seca sob sombreamento durante 7 dias e posteriormente foi triturada em moinho tipo Willey (modelo Tecnal TE 680, Piracicaba, SP, Brasil) em partículas de 2 mm de malha e acondicionado em frascos de vidro, a qual foi adicionado metanol até a cobertura total. A solução obtida foi filtrada, concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida e o resíduo do balão foi colocado em recipiente aberto para completar a remoção do solvente utilizando secadores de fluxo de ar contínuo até a exaustão completa do material.

### 2.3 Testes de Prospecção Fitoquímica

O extrato metanólico bruto de *U. humidicola* foi submetido a uma série de reações químicas para caracterização e detecção da presença de classes de metabólitos secundários (NEPOMUCENO et al., 2013): saponinas, taninos, alcaloide, flavonoides, aminoácidos não proteicos, carboidratos, glicosídeos cardioativos, sacarídeos, esteroides e tripernóides, catequinas e purinas.

Nos testes de prospecção Fitoquímica, os resultados foram qualificados quanta a sua intensidade e representados pelo sistema de cruces onde: (+++) presença grande, (++) presença notável, (+) presença leve e (0) ausência ou presença inconclusiva para cada classe de metabólito secundário analisado. Sendo interpretados por duas pessoas.

### 2.4 Composição Químico-Bromatológico da *Urochloa humidicola* e do Extrato Metanólico Bruto da *Urochloa humidicola*

Para determinação da composição químico-bromatológica as amostras secas foram moídas em moinho tipo Willey, com malha de 1 mm e armazenada em sacos plástico e do extrato metanólico de *Urochloa humidicola* acondicionada em recipientes de vidro, para avaliação dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), mistura mineral (MM), extrato etéreo (EE),

carboidratos não fibrosos (CNF), lignina, celulose e hemicelulose de acordo com a metodologia descrita por Silva e Queiroz (2002).

A determinação do extrato etéreo do extrato metanólico de *U. humidicola* foi determinado segundo a metodologia descrita por Bligh & Dyer (1959), utilizando clorofórmio, metanol, água destilada e sulfato de sódio a 1,5% nas proporções 1:1:0,8: 0,5, respectivamente, em relação a massa da amostra.

## **2.5 Análise Estatística**

A detecção e a identificação da quantidade dos metabólitos secundários do extrato metanólico de *Urochloa humidicola* foi descrito utilizando sistema de cruces e a determinação da composição bromatológica foram utilizadas 2 repetições do extrato de *Urochloa humidicola* e da *U. humidicola in natura* foram submetidas à análise de variância utilizando o programa SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007), sendo que as médias foram comparadas pelo teste de Fisher a 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Identificação das Classes de Metabólitos Especiais

A prospecção fitoquímica foi empregada com intuito de detectar outras classes metabólitos secundários diferentes de saponinas na amostra, que por ventura possam influenciar na qualidade do extrato (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultado dos ensaios qualitativos da Prospecção fitoquímica do extrato metanólico da *Urochloa humidicola*

Classe de Metabólito Secundário	Extrato Bruto Metanólico <i>Urochloa humidicola</i>
Saponina	+++
Tanino	+++
Alcaloídes	+++
Flavonóides	0
Aminoácido não proteico	+++
Carboidratos	+++
Glicosídeos cardioativos	+++
Esteróides e tripernóides	+++
Catequinas	+++
Sacarídeos	+++
Purinas	0

(+++) presença grande, (++) presença média, (+) presença leve e (0) ausência ou resultado inconclusivo.

Embora a Prospecção fitoquímica apresente menor acurácia quando comparado a outros métodos de identificação como análises cromatográficas, pois a técnica pode mascarar ou dificultar a interpretação de alguns dos resultados pela coloração (GRANATO et al., 2013). Apesar de servir como guia para o isolamento de substâncias, já que fornece uma visão geral quanto à química das espécies vegetais.

Neste trabalho o ensaio fitoquímico proporcionou uma informação geral do perfil químico da *U. humidicola*, apresentando a presença de outras classes de metabolitos no extrato. Possuindo grande presença para a maioria dos compostos, com ausência para as classes dos flavonoides e das purinas.

A idade e o desenvolvimento da planta apresentam consideráveis importâncias, pois podem influenciar não só a quantidade total de metabólitos produzido, bem como as proporções relativas dos componentes num todo (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). O que corroboram com o trabalho de Brum et al. (2009) que observaram um aumento no teores de protodioscina no período de maturação da *U. decumbens* e *U. brizantha* que houve, sugerindo aumento da toxicidade com a maturidade e, como trabalho de Meagher et al. (1996) que descrevem maiores quantidade das saponinas diosgenina, yamogenina e sapogenina em *U. decumbens* jovens quando comparados com as plantas em estágio de maturidade avançada.

Por ser um extrato bruto de *U. humidicola* contém uma ampla variedade de metabólitos secundários em sua composição. Pois, Alguns metabólitos possuem funções específicas dentro dos vegetais, proteção contra herbívoros e infecção por microrganismos patogênicos, (NEPOMUCENO et al., 2013).

Estes fatores torna a necessidade da purificação e do isolamento da saponina para comprovar o seu efeito isolado na alimentação animal. Já que outras substâncias presentes no extrato podem apresentar efeitos semelhantes, ou antagônicos. Por ser um extrato bruto de *U. humidicola* contém uma ampla variedade de metabólitos secundários em sua composição. Faz-se necessária a purificação e o isolamento para comprovar a verdadeira ação da saponina na alimentação animal. A presença de outros metabólitos no extrato não permite a extrapolação de resultados futuros para a saponinas, já que, as outras substâncias presentes no extrato podem apresentar efeitos semelhantes, ou antagônicos e até mesmo não afetar a fermentação ruminal.

### 3.2 Composição Bromatológica

Os resultados da análise bromatológica do extrato metanólico bruto e da *Urochloa humidicola in natura* estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Porcentagem de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos não fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), celulose (CEL) e hemicelulose (HEMI) com base na matéria seca da planta e extrato metanólico da *Urochloa humidicola* (*EmUh*)

Composição (%)	<i>U. humidicola</i>	<i>EmUh</i> *	CV
MS	89,36 A	81,42 B	0,66
PB	5,17 B	10,20 A	3,86
EE	1,57 B	35,00 A	1,18
MM	8,14 B	16,14 A	4,51
CNF	9,59 B	39,92 A	7,20
FDN	75,59 A	0,14 B	3,11
FDA	40,77 A	0,18 B	1,23
HEMI	34,81 A	0,00 B	5,38
CEL	29,73 A	0,21 B	0,63
LIG	7,19 A	0,17 B	2,19

Valores seguidos por letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Fisher a 5% de probabilidade (P<0,05). CV: coeficiente de variação. \* *EmUh*: extrato metanólico de *U. humidicola*.

A *U. humidicola* apresentou 5,17 % de PB, teor abaixo dos 11,74% encontrado por Pereira et al. (2011) no Alto Vale do Jequitinhonha em Minas Gerais utilizou plantas com 42 dias.

A diferença no teor de proteína pode estar relacionada à época do ano (corte realizado em outubro) e estágio fenológico da planta (120 dias após o último período de pastejo), além da característica do solo e ausência de adubações. O teor de proteína do extrato metanólico de *U. humidicola* de 10,2% superior ao encontrado na *U. humidicola in natura* 5,17% diferindo

entre si ( $P < 0,05$ ). O aumento destes constituintes pode ser explicado pelo método de extração o qual retira os componentes celulares como lignina, celulose e hemicelulose, disponibilizando somente conteúdo solúvel no solvente (metanol).

O teor de CNF foi obtido segundo a equação  $CNF = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%MM)$  proposta pelo NRC (2001). O teor de CNF na planta *in natura* e do extrato apresentou 9,59% e 39,92%, respectivamente, diferindo entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Fisher.

Os resultados dos teores de FDN, FDA e LIG: 75,59%, 40,77% 7,19%, respectivamente. Teores estes superiores aos encontrados por Pereira et al. (2011) que foram 68,10% de FDN, 43,91% de FDA e 5,10% de LIG para a *U. humidicola* colheitada com 42 dias. Os teores de hemicelulose e celulose da *U. humidicola in natura* de 38,82% e 29,73%, respectivamente.

O extrato metanólico apresentou 0,17% de lignina e 0,21% de celulose, isto pode ser explicado pelo método de extração que foi por maceração a frio com metanol, que extraiu somente os constituintes solúveis, carreando somente proteína, lipídeos e cinzas para o extrato.

## 4 CONCLUSÕES

O extrato metanólico de *Urochloa humidicola* apresenta características que permitem seu uso como aditivo natural ou fitogênico por apresentar diversos metabólitos secundários que podem induzir a fermentação ruminal.

A técnica de extração do extrato metanólico disponibiliza todos os constituintes solúveis o que propicia o uso do extrato como aditivo nutraceûtico.

São necessários maiores estudos de quantificação e caracterização da atividade dos metabólitos secundários presentes e com animal para sugerir o emprego do extrato metanólico bruto na alimentação animal.



## 5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BARBOSA-FERREIRA, M., BRUM, K. B., FERNANDES, C. E., MARTINS, C. F., PINTO, G. S., CASTRO, V. S., REZENDE, K. G., RIET-CORREA, F., HARAGUCHI, M., JUNIOR, H. L. W., LEMOS, R. A. A. Variations of saponin concentration in *Brachiaria brizantha* leaves as a function of maturation: preliminary data. In: Riet-Correa, F.; Pfister, J.; Schild, A.L. & Wierenga, T. (eds.). **Poisoning by plants, mycotoxins and related Toxins**. CAB International, p.118-23, 2011.

BARBOSA J.D., C.M.C. OLIVEIRA, C.H. TOKARNIA, AND P.V. PEIXOTO. Fotossensibilização hepatógena em eqüinos pela ingestão de *Brachiaria humidicola* (Gramineae) no Estado do Pará. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 26, n. 3, p. 147-153, 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BRUM, K. B.; HARAGUSHI, M.; GARUTTI, M. B.; NOBREGA, F. N.; ROSA, B.; FIORAVANTI, M. C. S. Steroidal saponin concentrations in *Brachiaria decumbens* and *B. brizantha* at diferente developmental stages. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 279-381, 2009.

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 high concentration of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal Animal Science**, v. 83, n. 11, p. 2572-2579, 2005.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, P. N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo do metabolismo secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GRANATO, E. M.; GRANATO, M. M.; GERENUTTI, M.; SILVA, M. G.; FERRAZ, H. O.; VILA, M. M. D. C. Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 130-135, 2013.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasil, 412 p., 1999.

KAMRA, D. N.; AGARWAL, N.; CHAUDHARY, L. C. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. **International Congress Series**, v. 1293, n. 1, p. 156-163, 2006.

MEAGHER, L. P.; MILES, C. O.; FAGLIARI, J. J. Hepatogenous photosensitization of ruminants by *Brachiaria decumbens* and *Panicum dichotomiflorum* in the absence of sporidesmin: lithogenic saponins may be responsible. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 271-274, 1996.

NEPOMUCENO, D. D.; ALMEIDA, J. C. C.; CARVALHO, M. G.; FERNANDES, R. D.; CATUNDA JÚNIOR, F. E. A. Classes of secondary metabolites identified in three legume species. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 10, p. 700-705, 2013.

NRC – NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed., Washington, D. C.: National Academic Press, 381 p, 2001.

PEREIRA, R. C.; RIBEIRO, K. G.; PEREIRA, G. O.; SILVA, J. L.; SANTOS, J. M.; RIGUEIRA, J. P. S. Produtividade e composição bromatológica de *Brachiaria* spp., no Alto Vale do Jequitinhonha. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 524-530, 2011.

**SAEG** - Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.

SANTRA, A.; SAIKIA, A.; BARUAH, K. K. Scope of rumen manipulation using medicinal plants to mitigate methane production. **Journal of Pharmacognosy**, v. 3, n. 2, p. 115-120, 2012.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos (métodos químicos e biológicos)**. 3. Ed., Viçosa: Imprensa Universitária da UFV, 235 p. 2002.

SIROHI, S. K.; GOEL, N.; SINGH, N. Utilization of saponins, a plant secondary metabolite in enteric methane mitigation and rumen modulation. **Annual Research & Review in Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2014.

SLIWINSKI, B. J.; SOLIVA, C. R.; MACHUMULLER, A.; KREUZER, M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 101, n. 1-4, p. 101-114, 2002.

TOKARNIA, C. H.; BRITO, M. F.; BARBOSA, J. D.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J. **Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção**. 2 ed. Editora Helianthus, Rio de Janeiro. 586p, 2012.

WANAPAT, M.; KANG, S.; POLYORACH, S. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 32, p. 1-11, 2013.

## **CAPÍTULO II**

### **EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO DE *UROCHLOA HUMIDICOLA* SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO***

## RESUMO

Os extratos vegetais de plantas são uma alternativa para indução da fermentação ruminal por possuírem metabólitos secundários, por serem de fontes naturais. A modulação da fermentação ruminal pode reduzir a produção de metano, aumentar a relação de acetato: propionato e melhorar a degradação do alimento. Devido este fato objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito da adição de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* contendo saponina sobre a produção de gases (metano e de dióxido de carbono), a cinética ruminal, a degradação da matéria seca e produção de ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) da *U. brizantha*. Foram testados quatro concentrações de extrato metanólico de *U. humidicola* (0, 75, 150 e 250 g/L) sobre a degradabilidade da *U. brizantha* pela produção de gases *in vitro*. A concentração de 150 g/L apresentou o maior valor produzido pelo carboidratos fibrosos de 118,21 mL. Enquanto a taxa de degradação dos carboidratos não fibroso foi de 0,25%/hora na concentração de 250 g/L. Com o aumento das concentrações de extrato (75, 150 e 250 g/L) os valores da fração solúvel foram de 10,27; 7,46 e 14,07%, respectivamente. Degradabilidade ruminal efetiva de nas concentrações de (75, 150 e 250 g/L) para um animal em manutenção foram de 38,53%, 27,71% e 20,30%, respectivamente. O aumento das concentrações de extrato exerceu um efeito linear ( $P < 0,00$ ) sobre os valores de pH ruminal. Promoveu uma redução nos valores de pH, na concentração de 250g/L o pH foi de 5,73 e 5,43 no tempo de 12 e 24 horas, respectivamente. As médias do volume de dióxido de carbono em função da matéria seca incubada e degradada não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ) com o aumento das concentrações de extrato no tempo de 12 horas. As médias de metano em função da matéria seca incubada e degradado não apresentaram significância para análise de regressão. A concentração de 250 g/L de extrato apresentou menor valor para produção de metano no tempo de 12 horas. A concentração de 75 g/L foi a que melhor estimulou o aumento do total de AGCC, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico tanto no tempo de 12 e 24 horas. Na concentração de 150 e 250g/L promoveu um aumento dos parâmetros da cinética da fermentação da *U. brizantha*. Entretanto causou um efeito negativo sobre a degradação da matéria seca da *U. brizantha* e no pH ruminal com o aumento das concentrações de extrato. Existe uma forte correlação entre os valores de pH e a degradação da matéria seca ( $p = 0,61$ ,  $P < 0,00$ ), com a diminuição do pH promoveu uma diminuição na degradação. O aumento das concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* promoveu um aumento na produção de gás e influenciou negativamente a degradação da matéria seca da *U. brizantha*. A adição de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* provocou a diminuição da produção de metano e influenciou positivamente a produção de ácidos graxos de cadeia curta total.

**Palavras-chave:** Saponina. Fermentação ruminal. Metano.

## ABSTRACT

Plant extracts are an alternative for inducing ruminal fermentation due to obtaining secondary metabolites as natural sources. Ruminal fermentation modulation can reduce methane production, increasing acetate: propionate ratio, as well as, improving food degradation. This survey aimed evaluating *Urochloa humidicola* methanol extract addition effect containing saponin on gases production (methane and carbon dioxide), ruminal kinetics, dry matter degradation and *U. brizantha* short chain fatty acids (acetate, propionate and butyrate) four *U. humidicola* concentrations (0, 75, 150 and 250 g/L) on *in vitro* production *U. brizantha* degradability were tested. However, the highest non-fibrous carbohydrate degradation rate at 250 g/L concentration was 0,25%/ hour. Increasing extract concentrations (75, 150, 250 g/L) soluble fraction values were: 10,27; 7,46 and 14,07%, respectively. Effective ruminal degradability at 75, 150 and 250 g/L concentrations for passage rates for an animal in maintenance were 38,53%, 27,71% and 20,30%, respectively. Extract concentration increase exerted a linear effect ( $P < 0,05$ ) on ruminal pH values, as well as, promoted pH values decrease at 250 g/L as 5,73 and 5,43 at 12 and 24 hs, respectively. CO<sub>2</sub> averages in regarding to incubated and degraded dry matter did not differ ( $P > 0,05$ ) with extract concentration increase at 12 hs. Methane averages in regarding to incubated and degraded dry matter were no significative regression analysis. Treatment at 250 g/L concentration presented the lowest value for methane at 12 hs. At 75 g/L concentration total SCFA (acetic, propionate and butyric acid) increase at 12 and 24 hs was reported. *U. humidicola* methanol extract different concentrations additive improved *U. brizantha* fermentation kinetics parameters at 150 and 250 g/L concentrations. However, negative effect on *U. brizantha* dry matter degradation and ruminal pH values according to extract concentrations increase was reported. Strong correlation between pH values and dry matter degradation ( $p = 0,61$ ,  $P = 0,00$ ) was presented. Increased methanol extract concentrations of *U. humidicola* promoted an intensification in gas production and negatively influenced the degradation of dry matter of *U. brizantha*. Addition of methanol extract of *U. humidicola* caused the decrease in methane production and positively influenced the production Total short-chain fatty acids.

**Keyword:** Saponin. Ruminal fermentation. Methane.

## 1 INTRODUÇÃO

Os parâmetros cinéticos da fermentação ruminal podem ser avaliados pela técnica de produção de gases *in vitro*. Técnica esta que permite o cálculo da taxa e da extensão da degradação do alimento, além de possibilitar a avaliação dos metabólitos gerados. Durante a fermentação ruminal dos carboidratos são produzidos ácidos graxos de cadeias curtas (AGCC) e gases como: hidrogênio, metano (CH<sub>4</sub>) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O metano além de ser um dos gases do efeito estufa (GEE), representa uma perda de 2 a 14% da energia bruta ingerida pelos ruminantes (PEREIRA, 2013).

Os antibióticos ionóforos são utilizados em nutrição de ruminantes para atenuar estas perdas e otimizar a eficiência energética, pelo maior aproveitamento do alimento pelo animal. Porém seu emprego na dieta animal tem sido criticado, pelo risco de favorecer o surgimento de microrganismos patogênicos a humano e animais resistentes aos antibióticos, utilizados em tratamentos de infecções (PEREIRA, 2013). Como mecanismo de induzir a fermentação ruminal, de forma a propiciar o aumento do desempenho do animal.

Gramíneas forrageiras constituem a principal fonte de alimentos para bovinos no Brasil, com destaque para o gênero *Urochloa* (ASSIS et al., 2003). Caracterizado pela produção de massa e adaptabilidade e diferentes tipos de solo e de clima. Mesmo apresentando esta importância, espécie deste gênero tal como *U. humidicola*, produzem metabólitos secundários entre os quais saponinas, associados ao seu sistema de defesa (WINA et al., 2005a), citada como fatores negativos na alimentação de ruminantes devido a promoção de enfermidades ou diminuição do desempenho dos animais que os consome (BRUM et al., 2007).

No entanto, diversos autores relataram os efeitos positivos do uso de saponinas isoladas de *Yucca schidigera* (XU et al., 2010), *Sapindus rarak* (WINA et al., 2005b) e *Sapindus saponária* (HESS et al., 2003) sobre a alteração do perfil de AGCC e diminuição da produção de CH<sub>4</sub> ruminal.

Devido o exposto objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito do extrato de *U. humidicola* sobre a produção de gases (metano e de dióxido de carbono), a cinética de fermentação ruminal, a degradação da matéria seca e produção AGCC (acetato, propionato e butirato) *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química, no Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro e no Laboratório de Digestibilidade e Produção de Gases do Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente a Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. Este trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e aprovado pela Comissão de Ética e Biossegurança da UFRRJ sob número 009319/2014.

### 2.1 Extrato Metanólico da *Urochloa humidicola* (EmUh)

A *Urochloa humidicola* foi colheitada em uma pastagem estabelecida, localizada no setor de Caprinocultura do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Latitude: 22°46'59" S, Longitude: 43°40'45" W e altitude de 33 m). O corte da *U. humidicola* foi realizado em outubro de 2013 foi colhida a 0,05 m do solo e seca a sombra durante uma semana (até ponto de feno) e posteriormente foi triturada em moinho tipo Willey (modelo Tecnal TE 680, Piracicaba, SP, Brasil) em partículas de 2 mm de malha.

A *Urochloa humidicola* foi colhida a 0,05 m do solo e seca a sombra durante 7 dias, até atingir ponto de feno. Após a secagem o material vegetal foi triturado em moinho tipo Willey (modelo Tecnal TE 680, Piracicaba, SP, Brasil) em partículas de 2 mm, e em seguida 1,063 Kg do material foi acondicionado em frascos de vidros embebido com metanol. O material foi filtrado, em funil de papel e a solução obtido foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, o resíduo remanescente da concentração foi colocado em recipiente aberto para completar a remoção do solvente utilizando secadores de fluxo de ar contínuo. Etapas estas realizadas várias vezes até a exaustão completa do material vegetal.

### 2.2 Produção de Gases *in vitro*

A técnica semiautomática de produção de gases *in vitro* foi conduzida de acordo com a metodologia Mauricio *et al.* (1999), adaptada para o uso das sacolas de filtragem.

Foram testados quatro concentrações do extrato de *Urochloa humidicola* (EmUh) (0; 75; 150 e 250 g/L), utilizando a técnica semiautomática de produção de gases *in vitro* segundo Mauricio *et al.* (1999). Adaptada para o uso de filtros F57 (Ankom®) utilizando *Urochloa brizantha* como substrato teste. Os filtros F57 com o material teste foram colocados em frascos de 50 mL. Em seguida foi adicionado 12 mL meio de cultura, 4 mL de líquido ruminal (obtido de 3 bovinos fistulados no rúmen), 0,5 mL de agente redutor (Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O + NaOH e água destilada) e 8,95 mL para cada concentração de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* (75, 150 e 250 g/L). Os frascos contendo o substrato em que foram adicionados o EmUh e os contendo as soluções de incubação sem substrato (brancos) foram vedados com rolhas de silicone e lacrados com anilhas de alumínio, para incubação em câmara climatizada a 39 °C.

A produção dos gases foi determinada por transdutor de pressão (Druck 705®), às 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72 e 96 horas de incubação. Para a conversão do valor de pressão em volume, foi utilizada a equação  $V = -0,013 p^2 + 3,60p + 0,11$ ; R<sup>2</sup> = 0,99, desenvolvida para as condições locais. Em que V = volume total de gases e "p" é a pressão dos gases dentro dos frascos de fermentação.

Os parâmetros de cinética de fermentação da *Urochloa brizantha* foram estimados pelo modelo bicompartimental proposto por Pell & Schofield (1993). Os parâmetros V1, C1, V2 e C2 foram ajustados por regressão não linear pelo método Gaus-Newton, utilizando o "software" SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007).

$$V = \left( \frac{V1}{(1 + \exp(2 - 4 * C1 * (T - L)))} + \frac{V2}{(1 + \exp(2 - 4 * C2 * (T - L)))} \right)$$

Onde: V= o volume final de gás acumulado no tempo t (mL), V1= volume máximo de gás produzido pela fermentação da fração de carboidrato não fibroso (CNF) (mL), C1= a taxa de degradação em (%h<sup>-1</sup>) dos CNF, L= latência ou o tempo de colonização (h), V2= volume máximo de gás produzido pela fermentação da fração de carboidrato fibroso (CF) (mL), C2= sendo a taxa de degradação (%h<sup>-1</sup>) dos CF e T= é o tempo de incubação (horas).

### 2.3 Degradabilidade *in vitro* de *Urochloa brizantha* em Meio Contendo Extrato Metanólico Bruto de *Urochloa humidicola*

A degradabilidade da matéria seca da *U. brizantha* foi avaliada nos períodos 12, 24, 48 e 96 horas. A determinação do pH do líquido ruminal foi realizada logo após a colheita, em potenciômetro digital dos tempos de 12 e 24 h. A diferença entre os pesos antes e após a incubação possibilitou estimar a quantidade de MS do resíduo. Os parâmetros de degradabilidade *in vitro* foram obtidos pelo algoritmo de Marquardt do programa estatístico computacional SAEG, versão 9.1 (UFV, 2007). Os dados das degradações da forragem foram submetidos à análise de regressão, utilizando o modelo de Orskov e McDonald (1979):

$$DP = A - (B * e^{-c*t})$$

Onde: D= degradabilidade ruminal potencial dos alimentos; A= é fração solúvel; B= é o total a ser degradado pela ação microbiana se não houvesse tempo de colonização; c: taxa constante de degradação da fração que permanece no saco F57; e t= é o tempo de incubação.

A degradabilidade ruminal efetiva (DE) da matéria seca foi calculada a partir do modelo proposto por:

$$DE = a + \frac{b * c}{c + K}$$

Onde: a= fração solúvel (tempo zero), b= fração insolúvel potencialmente degradável, c= taxa de degradação por ação fermentativa de b e K= é a taxa de passagem de sólidos pelo rúmen, definida aqui como 2, 5 e 8 %/h.



## 2.4 Produção de Metano (CH<sub>4</sub>) e Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) *in vitro*

Para a determinação de CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> produzidos foram colhidos os gases produzidos durante a fermentação da *U. brizantha* a qual foi incubada com EmUh nas concentrações de 0, 75, 150 e 250 g/L com seringas após as leituras de pressão nos tempos de 12 e 24 horas e sendo colocados 5,0 mL de gás nos vacuntainers (15 mL). Foram amostrados cerca de 1 mL para quantificação do CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> realizada no Laboratório de Cromatografia Gasosa (EMBRAPA Gado de Leite), em Cromatógrafo de fase gasosa da marca Agilent Technologies 7820 A.

## 2.5 Ácidos Graxos de Cadeia Curta (AGCCs) Provenientes da Fermentação da *Urochloa brizantha in vitro* com Adição do Extrato Metanólico Bruto de *Urochloa humidicola*

Para a separação e quantificação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram amostradas 10 mL do material incubado com o extrato da *Urochloa humidicola* nas concentrações de 75, 150 e 250 g/L. Após a paralisação do processo fermentativo nos tempos de 12 e 24 horas, com adição de gelo no recipiente contendo os frascos.

Após esta etapa foi adicionado aos frascos 2 mL de ácido metafosfórico. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 min. Sendo o sobrenadante filtrado com filtro Millex e transferindo para os Vials. E encaminhado para a determinações dos AGCC foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se o cromatógrafo da Waters alliance e 2695 com Detector PAD 2998 (*photodiode array detector*), com sistema de separação constituído de coluna de fase reversa C18 ODS 80A (150 x 4,6 mm x 5 µm).

## 2.6 Análise Estatística

Para a produção de gás foi utilizado o delineamento de blocos (inóculos) casualizados em esquema fatorial 3x4x4 (3 blocos, 4 concentrações de extrato metanólico de *U. humidicola* e 4 tempos de incubação).

O modelo estatístico utilizado no ensaio da cinética de fermentação ruminal foi:

$$Y_{ijk} = \mu + a_i + \varepsilon_{(ij)} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + wk + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

$Y_{ijk}$  = variável dependente (Gás);

$\mu$  = média geral;

$a_i$  = Efeito dos níveis do extrato metanólico de *U. humidicola* (0, 75, 150, 250 g/L);

$\beta_j$  = Efeito dos tempos de degradação (12, 24, 48 e 96 horas);

$\varepsilon_{(ij)}$  é o efeito do nível i do fator  $\alpha$  na repetição k (erro a);

$(\alpha\beta)_{ij}$  = É o efeito da interação entre os níveis de extrato metanólico de *U. humidicola* com os tempos de degradação;

$wk$  = Efeito do bloco (inóculos);

$e_{ijk}$  = erro experimental (erro b).

Para a degradabilidade *in vitro* foi utilizando o delineamento de blocos (inóculo) casualizados (DBC) em esquema de parcelas subdivididas, considerando os níveis do extrato como parcelas e o tempo de degradação como subparcelas.

O modelo estatístico utilizado no ensaio de degradação da matéria seca (DMS) foi:

$$Y_{ijk} = \mu + ai + \varepsilon_{(i)j} + \delta_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \omega_k + e_{ijk}, \text{ onde:}$$

$Y_{ijk}$  = variável em estudo (DMS);

$\mu$  = média geral;

$ai$  = é o efeito dos níveis do extrato (0, 75, 150, 250 g/L) na variável em estudo;

$\varepsilon_{(i)j}$  é o efeito do nível  $i$  do fator  $\alpha$  na repetição  $k$  (erro a);

$\delta_{ik}$  = é o efeito residual das parcelas, caracterizado como componente do erro (a);

$\beta_j$  = é o efeito do tempo de degradação (12, 24, 48 e 96 horas) na variável em estudo;

$(\alpha\beta)_{ij}$  = é o efeito da interação dos níveis do extrato e o tempo de degradação;

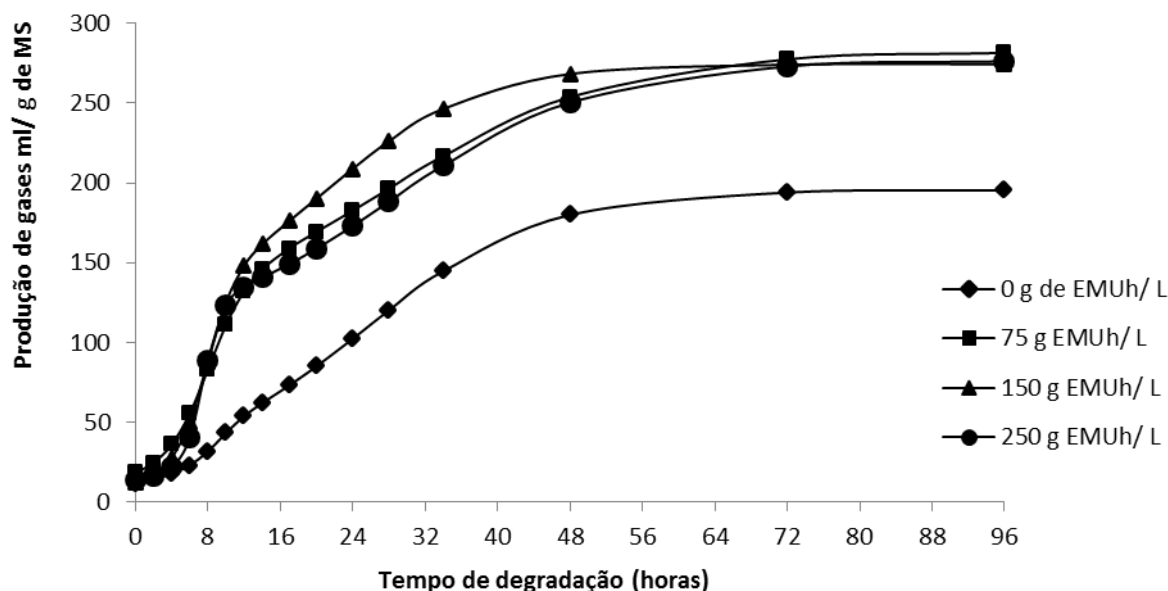
$\omega_k$  = é o efeito do bloco na variável em estudo;

$e_{ijk}$  = efeito residual das subparcelas, caracterizado como componente do erro (b).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Efeito da Adição de Extrato Metanólico Bruto de *Urochloa humidicola* sobre a Cinética da Produção de Gás e na Degradação da *Urochloa brizantha* e no pH

A adição de extrato metanólico bruto de *Urochloa humidicola* proporcionou um aumento na produção de gases em relação ao controle. Entretanto, na concentração de 150 g/L foi observado uma maior produção de gás nos períodos de 12 a 48 horas de fermentação, que apresentou tendência à estabilização (Figura 1). Já na concentração de 75 g/L nos tempos de 72 a 96 horas apresentou um leve aumento em relação às demais concentrações.



**Figura 1.** Curva de produção cumulativa de gases da *Urochloa brizantha* nas diferentes concentrações de extrato metanólico bruto de *Urochloa humidicola* (EmUh)

A adição de extrato *U. humidicola* proporcionou a redução da produção de gases (V1) proveniente da fração dos CNF da *U. brizantha* nas concentrações de 75 e 150 g/L. Enquanto que a adição do extrato na concentração de 250 g/L promoveu um aumento em relação ao controle (Tabela 1). Conforme Luz et al. (2014) as maiores taxas de produção de gás das frações dos CNF indicam que a degradação destes ocorre em maior velocidade, e que é disponibilizado mais rápido para os microrganismos ruminais.

**Tabela 1.** Estimativa dos parâmetros cinéticos da produção de gases *in vitro* da matéria seca (MS) da *Urochloa brizantha* nas diferentes concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola*

Parâmetros	0 g/ L	75 g/ L	150 g/ L	250 g/ L
V1 (mL)	172,99	169,86	156,23	174,76
C1 (%/ hora)	0,16	0,11	0,15	0,25
L (horas)	6,08	3,67	4,59	5,51
V2 (mL)	22,43	112,31	118,21	101,92
C2 (%/ hora)	0,03	0,02	0,03	0,02

V1: volume máximo de gás produzido pelos carboidratos não fibrosos (CNF) (mL), C1: taxa de digestão para a fração de CNF (%h<sup>-1</sup>), L: latência (horas), V2: volume máximo de gás produzido pelos Carboidrato fibroso (CF) (mL) e C2: taxa de digestão para a fração de CF (%h<sup>-1</sup>). Significância dos parâmetros do modelo pelo teste de Fisher (P<0,05).

O maior volume de gases da fração dos CF (V2: 118,21 mL) foi obtido com a adição de 150 g/L do extrato, já a adição de 75 e 250 g/L produziram 112,31 e 101,92 de gás, respectivamente. Os carboidratos fibrosos são constituídos pela celulose, hemicelulose e lignina. A degradação da fibra é dependente do tempo de exposição aos microrganismos ruminais (QUEIROZ et al., 2011).

A adição de do extrato, promoveu a diminuição do período de latência em relação ao controle. O período de latência é uma fase importante para as bactérias, por permitirem a adesão e a colonização às partículas dos alimentos e início da degradação (OLIVEIRA et al., 2007).

O extrato influenciou de forma negativa a degradação do substrato utilizado. Tanto no período de 12 quanto no de 24 horas foi observado efeito linear (P=0,00) sobre a DMS da *U. brizantha* incubada, para as diferentes concentrações de extratos adicionado (Tabela 2 e 3).

**Tabela 2.** Produção de gás, degradação da matéria seca degradada (DMS) e pH do líquido ruminal nas diferentes concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* no tempo de 12 horas

Parâmetro	Concentração				EPM	Valor de P	
	0	75	150	250		Linear	Quadrática
Gás	51,33	127,67	144	132,67	10,25	0.000	0.000
DMS	27,33	24,13	20,73	19,19	1,48	0.000	0.000
pH	6,88	6,57	6,28	5,73	0,10	0.000	0.000

EPM: Erro Padrão Médio. Teste de Fisher (P<0,05).

O aumento da concentração dos extratos exerceu um efeito linear (P=0,00) sobre os valores de pH ruminal. A adição de extrato proporcionou um decréscimo dos valores de pH do líquido ruminal *in vitro*.

O pH adequado para a atuação de bactérias fibrolíticas e os protozoários varia de 6,2 a 6,8 (OLIVEIRA et al., 2013). Nos tempos de 12 e 24 horas foram encontrados valores de 5,73 e 5,43, para a adição de 250 g/L, respectivamente (Tabela 2 e 3). Alteração do pH pode afetar de forma negativa a degradação da fração fibrosa (SILVEIRA et al., 2009).

Os carboidratos não fibrosos e o extrato etéreo podem promover a diminuição dos valores do pH ruminal. Que influencia negativamente a fermentação ruminal (SANTOS et al., 2012). Com isto, o pH é um fator determinante para a prevalência dos microrganismos no

ambiente ruminal, e mudanças bruscas podem interferir na digestibilidade das forrageiras de baixa (WILBERT et al., 2011). No presente trabalho foi observada uma correlação moderada entre o pH e a degradação da matéria seca ( $r: 0.61, P=0,00$ ).

**Tabela 3.** Produção de gás, degradação da matéria seca degradada (DMS) e pH do líquido ruminal nas diferentes concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* no tempo de 24 horas

Parâmetro	Doses				EPM	Valor de P	
	0	75	150	250		Linear	Quadrática
pH	6,69	6,42	6,15	5,43	0,15	0.00	0.00
DMS	41,02	32,73	25,72	19,55	2,44	0.00	0.00
Gás	102,67	185,67	210	172,33	13,06	0.04	0.00

EPM: Erro Padrão Médio. Teste de Fisher ( $P<0,05$ ).

A adição do extrato nas concentrações de 75, 150 e 250 g/L aumentou a quantidade de carboidratos solúveis o que promoveu um aumento dos valores da fração solúvel (a) da matéria seca da *U. brizantha* em 10,27; 7,46 e 14,07% em relação ao controle, respectivamente. O que corrobora com o encontrado por Guimarães et al. (2010) que elevados valores da fração (a) indicam um material bastante degradável. No entanto, promoveu uma redução da degradação da fração (b) em 20,06; 44,98 e 66,03, quando comparada ao controle (Tabela 4).

**Tabela 4.** Estimativas dos parâmetros da degradação ruminal *in vitro* da MS da *Urochloa brizantha* em meio contendo extrato metanólico bruto de *Urochloa humidicola*

Concentrações	Parâmetros			DE			R2
				K (%/ hora)			
	a (%)	b (%)	c (%)	2	5	8	
0 g/ L	3.50	70.25	0.03	47.50	31.70	24.25	0,99
75 g/ L	13.77	50.19	0.02	38.53	27.84	23.60	0,95
150 g/ L	10.96	25.27	0.04	27.71	22.08	19.29	0,98
250 g/ L	17.57	4.22	0.03 <sup>NS</sup>	20.30	19.31	18.85	0,63

**a:** fração solúvel da matéria seca, **b:** fração insolúvel potencialmente degradável da matéria seca, **c:** taxa de degradação por ação fermentativa de **b**, **DE:** degradabilidade ruminal efetiva e **K:** taxas estimadas de passagem (2; 5 e 8 %/ hora), representando animais com baixo, médio e alto consumo, respectivamente. Significância dos parâmetros do modelo.

Considerando para a matéria seca da *U. brizantha* as taxas de passagem (k) os valores de 2; 5 e 8%/hora. A adição dos diferentes níveis do extrato influenciou negativamente a degradação do substrato utilizado, para um animal em manutenção foi que apresentou o melhor resultado.

O extrato metanólico de *U. humidicola* apresentou 39,92 % de CNF e 35,00% de extrato etéreo, que podem ter contribuído para a queda do pH e ainda pode ter afetado a degradação da matéria seca direta e indiretamente.

Segundo Oliveira et al. (2013) afirmaram que o alimento ingerido pelo animal influencia diretamente a população microbiana presente no rúmen. Farenzena (2010)

observou que na presença de carboidratos potencialmente fermentáveis os microrganismos suprem suas necessidades de energia, não necessitando da aderência a partículas de alimentos para consegui-las.

A redução da degradação da matéria seca pode estar também relacionada a alguns componentes inerentes à própria planta, como o grau de lignificação e proteção da cutícula que formam uma barreira à adesão e a degradação pelas bactérias do rúmen (MCALLISTER et al., 1994). Devido a presença de metabólitos secundários com ação antimicrobiana no EmUh a degradação da matéria seca da *U. brizantha* pode ter sido diminuída.

Segundo Van Soest (1994) os taninos e outros polifenóis protegem a celulose e a proteína da degradação ruminal. A condensação dos ácidos fenólicos (taninos) leva a formação de lignina, sendo seus principais precursores (BRITO et al., 2003). Promovem a redução da digestibilidade da celulose, por limitar a ação da celulase sobre a celulose, porque os feixes de celulose se apresentam dispersos em uma matriz de hemicelulose e lignina (BRITO et al., 2003).

Outro fator que pode atrapalhar a degradação da matéria seca é a redução do pH ruminal. Por exemplo, as saponinas possuem o efeito defaunante, pois formam complexos com o colesterol de membrana dos protozoários (SIROHI et al., 2014).

Os protozoários são responsáveis pela engolfamento do amido, impedindo que sejam absorvidos pelas bactérias e sejam imediatamente degradados e ocorra uma diminuição do pH (WANG et al., 2012). De acordo com Farenzena (2010) relatou que as bactérias celulolíticas não conseguem crescer em pH baixo, e quando ocorre diminuição do pH ruminal ocorre um desequilíbrio no gradiente a nível de membrana acarretando uma toxicidade pelo acúmulo de ânions no seu interior.

### **3.2 Produção de Metano (CH<sub>4</sub>) e Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>)**

Adição de extrato promoveu efeito quadrático (P=0,00) sobre a produção de CO<sub>2</sub>/ g de matéria seca incubada e g de matéria seca degradada no tempo de 12 horas (Tabela 5). Isto pode ter sido ocasionado pela composição do extrato em que a proporção de CNF foi em 39,92%, constituindo-se em substrato de rápida fermentação, fator este que pode ter contribuído para o aumento da produção de CO<sub>2</sub> *in vitro*.

Pen et al. (2006) descreveram que a adição de extratos de *Yucca schidigera* e *Quillaja saponária* sobre a fermentação *in vitro* aumentaram as extensões de produção do CO<sub>2</sub> e que pode ser explicado pelo aumento da população microbiana. Segundo Wanapat et al. (2013) plantas ou extratos contendo saponinas possuem efeito de diminuir ou eliminar a população de protozoários do rúmen, defaunação. Segundo Belanche et al. (2014) a eliminação dos protozoários do ecossistema ruminal, pode ser uma estratégia de mitigação da produção de metano.

**Tabela 5.** Produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) em mL/ g de matéria seca de *U. brizantha* incubada: CO<sub>2</sub>MLI, gás carbônico (CO<sub>2</sub>) em mL/ g de matéria seca de *U. brizantha* degradada: CO<sub>2</sub>MLD, metano (CH<sub>4</sub>) em mL/ g de matéria seca de *U. brizantha* incubada: CH<sub>4</sub>MLI e metano (CH<sub>4</sub>) em mL/ g de matéria seca de *U. brizantha* degradada: CH<sub>4</sub>MLD no tempo de 12 horas

Parâmetro	Nível				EPM	Valor de P	
	0	75	150	250		Linear	Quadrática
CO <sub>2</sub> MLI	4,39	12,17	12,57	12,15	1,66	0,007	0,000
CO <sub>2</sub> MLD	16,37	50,55	61,14	63,68	7,63	0,000	0,000
CH <sub>4</sub> MLI	0,52	1,28	0,21	0,00	0,37	NS	NS
CH <sub>4</sub> MLD	1,93	5,5	1,02	0,06	1,13	NS	NS

EPM: Erro Padrão Médio. Teste de Fisher (P>0,05), NS: Não significativo.

A diminuição da produção de CH<sub>4</sub> está relacionada a sensibilidade das archeas metanogênicas a diminuição do pH no ambiente ruminal, o que promove uma redução da atividade desses microrganismos (PEREIRA et al., 2013).

A inclusão do extrato não afetou (P>0,05) na produção de metano (Tabela 5). As dietas a base de forragens tendem a aumentar a síntese de metano ruminal, devido a maior produção de H<sub>2</sub>, que por sua vez é utilizada pelas archeas metanogênicas para a formação do metano (OLIVEIRA et al., 2013).

O extrato de *U. humidicola* nas concentrações de 150 e 250 g/L afetou de forma negativa a degradação da matéria seca da *U. brizantha*. Que confirma o encontrado por Holtshausen et al. (2009) que utilizaram extrato de plantas contendo metabólitos secundários (saponinas) observaram diminuição da produção de CH<sub>4</sub>, associada a menor taxa de fermentação do alimento no rúmen.

Conforme foi visto com o aumento das concentrações de extrato no meio de cultura promoveu uma redução nos valores de pH. A concentração de 250 g/L foi que apresentou o menor pH e pode estar associado a aumento dos valores de CO<sub>2</sub> tanto na matéria seca incubada quanto na degradada, pois as archeas metanogênicas são responsáveis pela retirada do H<sub>2</sub> do meio e o utilizam para degradar a CH<sub>4</sub> (KOZLOSKI, 2009).

A produção de gás carbônico da *U. Brizantha* incubada nas diferentes concentrações de extrato no tempo 12 horas não diferiram entre si (P>0,05). Com adição crescente de extratos em relação à de produção de CO<sub>2</sub> obtida pela degradação da matéria seca de *U. brizantha* foi superior a concentração de 250 g/L apresentou maior produção de gás carbônico (130,92 mL/g de matéria seca).

O metano é proveniente do processo de fermentação dos microrganismos ruminais, acarretando perdas energéticas para o animal e além de contribuir com a poluição do ambiente por ser um gás do efeito estufa (TADESSE, 2014). Altas concentrações de saponinas podem causar defaunação e podem afetar significativamente as atividades da fermentação ruminal (SIROHI et al., 2014).

As concentrações de 150g/L e 250 g/L apresentaram as menores produções de metano (P<0,05). O que pode estar relacionado ao pH, por ter influenciado na redução da atividade das metanogênicas, assim como o efeito defaunante das saponinas sobre os protozoários. Segundo Sirohi et al. (2014) o efeito da saponina é dose dependente em relação a metanogênese no rúmen.

### 3.3 Ácidos Graxos de Cadeia Curta

A adição de 75 g/L de extrato de *U. humidicola* promoveu um aumento do total de ácido graxo de cadeia curta na fermentação da *U. brizantha* de (20,13) em relação ao tratamento controle. Para o ácido propiônico gerou um aumento de (7,03) e butírico (3,98) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Produção de total de ácido graxo de cadeia curta em  $\mu\text{mol/ mL}$  (AGCC), ácido acético em  $\mu\text{mol/ mL}$  (ACE), ácido propiônico em  $\mu\text{mol/ mL}$  (PRO) e ácido butírico em  $\mu\text{mol/ mL}$  (BUT) durante o processo de fermentação da *Urochloa brizantha* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* no tempo de 12 horas

Parâmetro	Nível				EPM	Valor de P	
	0	75	150	250		Linear	Quadrática
AGCC	12,55	32,68	23,11	23,22	2,06	NS	NS
ACE	7,69	20,28	19,61	17,55	1,31	0,04	0,00
PRO	3,4	10,43	-	4,07	0,96	NS	NS
BUT	1,46	5,44	3,5	1,6	0,48	NS	0,02

(-) pico com coeluição impedindo a quantificação. EPM: Erro Padrão Médio. Teste de Fisher ( $P > 0,05$ ), NS: Não significativo.

O extrato de metanólico bruto de *U. humidicola* possui uma série de compostos secundários que podem estar associados com a melhora da produção destes ácidos graxos tanto no total, quanto isolados.

Reduções no pH ruminal estão associados com aumento na concentração total de AGCC, que geralmente são acompanhados por aumentos na fração de propionato (BELEOSOFF, 2013). A maior produção de ácido propiônico e menor de ácido acético e ácido butírico, produz uma menor quantidade de  $\text{H}_2$  e, conseqüentemente menor produção de  $\text{CH}_4$  (NAVARRO-VILLA et al., 2011), além de ser a única reação que não produz  $\text{CO}_2$  (GUIMARÃES JÚNIOR et al., 2008).

A produção de ácido acético produzido durante o período de 12 horas obteve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) (Tabela 6). A degradação dos carboidratos fibrosos (celulose e hemicelulose) produz maior proporção de acetato, enquanto que a degradação dos carboidratos solúveis (amido e açúcares) eleva a produção de propionato, diminuindo a proporção de acetato e butirato (MOTA et al., 2010). Isso acontece, pois os carboidratos de rápida fermentação ocasionam a diminuição do pH que acarreta na morte das bactérias fibrolíticas e dos protozoários (principais produtores de acetato) (OLIVEIRA et al., 2013).

Não houve significância para a análise de regressão. A adição de 75 g/L de extrato promoveu um aumento de total de AGCC (24,10), para o ácido acético (13,23), para o ácido propiônico (8,23) e para o ácido butírico (5,1) em relação ao controle no tempo de 24 horas (Tabela 7).



**Tabela 7.** Produção de total de ácido graxo de cadeia curta em  $\mu\text{mol/ mL}$  (AGCC), ácido acético em  $\mu\text{mol/ mL}$  (ACE), ácido propiônico em  $\mu\text{mol/ mL}$  (PRO) e ácido butírico em  $\mu\text{mol/ mL}$  (BUT) durante o processo de fermentação da *Urochloa brizantha* em meio de cultura contendo diferentes concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* no tempo de 24 horas

Parâmetro	Doses				EPM	Valor de P	
	0	75	150	250		Linear	Quadrático
AGCC	18,45	42,55	26,79	25,44	3,13	NS	NS
ACE	11,7	24,93	22,21	18,31	2,06	NS	NS
PRO	4,49	12,72	-	9,04	1,57	NS	NS
BUT	2,26	7,36	4,58	1,1	0,80	NS	NS

(-) pico com coeluição impedindo a quantificação. EPM: Erro Padrão Médio. Teste de Fisher ( $P>0,05$ ). NS: Não significativo.

De acordo com Xu et al. (2010) observaram que com adição de extrato de *Yucca schidigera* diminui a proporção de metano e a produção de metano no tempo de 24 horas, mas não afetou a concentração total de AGCC ou as proporções com exceção do butirato, que diminui com a adição do extrato. As alterações nas proporções molares de AGCC promovem alteração na produção de gases (ARAUJO, 2010). A alta taxa de passagem esta associada com os caminhos da fermentação e quanto maior a proporção de ácido propiônico formado menor quantidade de  $\text{H}_2$  é formado e conseqüentemente diminui a produção de metano (JANSSEN, 2010).

#### 4 CONCLUSÕES

O aumento das concentrações de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* promoveu um aumento na produção de gás e influenciou negativamente a degradação da matéria seca da *Urochloa brizantha*.

A adição de extrato metanólico de *Urochloa humidicola* provocou a diminuição da produção de metano e influenciou positivamente a produção de ácidos graxos de cadeia curta total.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

O extrato metanólico bruto de *Urochloa humidicola* tem potencial para uso como indutor da fermentação ruminal.

São imprescindíveis novos estudos com o extrato de *Urochloa humidicola*, utilizando animais para se comprovar a eficiência na utilização como aditivo alimentar.

## 6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ASSIS, G. M. L.; EUCLYDES, R. F.; CRUZ, C. D.; VALLE, C. B. Discriminação de espécies de *Brachiaria* baseada em diferentes grupos de caracteres morfológicos. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 32, n. 3, p. 576-584, 2003.

ARAÚJO, R. C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação *in vitro***. 2010. 178p. Tese (Doutorado em Ciências). USP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 2010.

BELANCHE, A.; FUENTE, G. L.; NEWBOLD, C. J. Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 90, n. 3, p. 663–677, 2014.

BELEOSOFF, B. S. **Potencial de produção de gases totais e metano *in vitro* de pastagens de *panicum maximum* jacq. cv. tanzânia submetida a diferentes manejos de pastejo**. 2013. 145 p. Tese de Doutorado. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BRITO, C. J. F. A.; RODELLA, R. A.; DESCHAMPS, F. C. Perfil químico da parede celular e suas implicações na digestibilidade de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria humidicola*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, supl. 2, p.1835-1844, 2003.

BRUM, K. B.; HARAGUCHI, M.; LEMOS, R. A. A.; RIET-CORREA, F.; FIORAVANTI, M. C. S. Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 39-42, 2007.

FARENZENA, R. **Aderência e atividade fibrolíticas bacteriana ruminal: efeito do pH e da Concentração de carboidratos solúveis**. 2010, 101p. Dissertação. (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal De Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

GUIMARÃES JR, R.; CABRAL FILHO, S. L. S.; FERNANDES, F. D.; VILELA, L.; MARTHA JR, G. B. **Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na Embrapa Cerrados**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. p. 8 (Comunicado Técnico, 144 – Embrapa), 2008.

HESS, H. D.; KREUZER, M.; DIAZ, T. E.; LASCANO, C. E.; CARULLA, J. E.; SOLIVA, C. R.; MACHMÜLLER, A. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. **Animal Feed Science and Technology**, v. 109, n. 1-4, 79-94, 2003.

HOLTSHAUSEN, L.; CHAVES, A. V.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MCALLISTER, T. A.; ODONGO, N. E.; CHEEKE, P. R.; BENCHAAAR, C. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 6, p. 2809–2821, 2009.

JANSSEN, P. H. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. **Animal Science Science and Technology**, v. 160, n. 1-2, p. 1-22, 2010.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2 ed. Santa Maria: Universidade Federal Santa Maria. p. 216, 2009.

LUZ, Y. S.; FIGUEIREDO, M. P.; OLIVEIRA, F. M.; BERNARDINO, F. S.; NOVAES, E. J.; ROSEIRA, J. P. S. Cinética da fermentação ruminal *in vitro* de dietas contendo palma forrageira enriquecida com ureia e suplementadas com diferentes fontes de amido. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1501-1514, 2014.

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

MCALLISTER, T. A.; BAE, H. D.; JONES, G. A.; CHENG, K. J. Microbial Attachment and Feed Digestion in the Rumen. **Journal Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 3004-3018, 1994.

MOTA, M. F.; VILELA, D.; SANTOS, G. T.; ELYAS, A. C. W.; LOPES, F. C. F.; VERNEQUE, R. S.; PAIVA, P. C. A.; PINTO NETO, A. P. Parâmetros ruminais de vacas leiteiras mantidas em pastagem tropical. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 226, p. 217- 224, 2010.

NAVARRO-VILLA, A.; O'BRIEN, M.; LÓPEZ, S.; BOLAND, T. M.; O'KIELY, P. Modifications of a gas production technique for assessing *in vitro* rumen methane production from feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, n. 1, p. 163-174, 2011.

OLIVEIRA, V. S.; SANTANA NETO, J. A.; VALENÇA, R. L. Características químicas e fisiológicas da fermentação ruminal de bovinos em pastejo – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 20, p. 1-21, 2013.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v. 8, n. 6, p. 1-12, 2007.

ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubations measurements weighted according to the rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v. 92, n.2, p. 499-503, 1979.

PELL, A. N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal Dairy Science**, v. 76, n. 4. p.1063-1073. 1993.

PEN, B.; SAR, C.; MWENYA, B.; KUWAKI, K.; MORIKAWA, R.; TAKAHASHI, J. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on *in vitro* ruminal fermentation and methane emission. **Animal Feed Science and Technology**, v.129, n. 3-4, p. 175–186, 2006.

PEREIRA, L. G. R. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 26, n. 1, p. 264-277, 2013.

QUEIROZ, M. F. S.; BERCHIELLI, T. T.; MORAIS, J. A. S.; MESSANA, J. D.; MALHEIROS, E. B.; RUGGIERI, A. C. Digestibilidade e parâmetros ruminais de bovinos consumindo *brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Archivos de zootecnia**, v. 60, n. 232, p. 997-1008, 2011.

**SAEG** - Sistema para Análises Estatísticas, versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes – UFV – Viçosa, 2007.

SANTOS, V. C.; EZEQUIEL, J. M. B.; MORGADO, E. S.; HOMEM JÚNIOR, A. C.; FÁVARO, V. R.; AUREA, A. P. D.; SOUZA, S. F.; BARBOSA, J. C. Influência de subprodutos de oleaginosas sobre parâmetros ruminais e a degradação da matéria seca e da proteína bruta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.5, p.1284-1291, 2012.

SILVEIRA, R. N.; BERCHIELLI, T. T.; CANESIN, R. C.; MESSANA, J. D.; FERNANDES, J. J. R.; PIRES, A. V. Influência do nitrogênio degradável no rúmen sobre a degradabilidade *in situ*, os parâmetros ruminais e a eficiência de síntese microbiana em novilhos alimentados com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.3, p.570-579, 2009.

SIROHI, S. K.; GOEL, N.; SINGH, N. Utilization of saponins, a plant secondary metabolite in enteric methane mitigation and rumen modulation. **Annual Research & Review in Biology**, v. 4, n. 1, p. 1-19, 2014.

TADESSE, G. Rumen manipulation for enhanced feed utilization and improved productivity performance of ruminants: a review. **Momona Ethiopian Journal of Science**, v. 6, n. 2, p. 3-17, 2014.

VAN SOEST, P. J. **Nutricional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell Press/Constock Publish. p.476, 1994.

WANAPAT, M.; KANG, S.; POLYORACH, S. Development of feeding systems and strategies of supplementation to enhance rumen fermentation and ruminant production in the tropics. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, n. 32, p. 1-11, 2013.

WANG, J. K.; YE, J. A.; LIU, J. X. Effects of tea saponins on rumen microbiota, rumen fermentation, methane production and growth performance—a review. **Tropical Animal Health Production**, v. 44, n. 4, p. 697-706, 2012.

WILBERT, C. A.; PRATES, E. R.; BARCELLOS, J. O. J.; GENRO, T. C. M.; SILVEIRA, A. L. F.; CHRISTOFARI, L. F. Suplementação energética e proteica de um volumoso de baixa qualidade pela técnica de produção cumulativa de gás *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 7, p. 1603-1612, 2011.

WINA, E.; MUETZEL, S.; BECKER, K. The impact of saponins or saponincontaining plant materials on ruminant productions: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 21, p. 8093-8105, 2005a.

WINA, E.; MUETZEL, S.; HOFFMANN, E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Saponins containing methanol extract of *Sapindus rarak* affect microbial fermentation, microbial

activity and microbial community structure *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v. 121, n. 1-2, p. 159-174, 2005b.

XU, M.; RINKER, M.; MCLEOD, K. R.; HARMON, D. L. Yucca schidigera extract decreases in vitro methane production in a variety of forages and diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, n. 1-2, p. 18-26, 2010.

## ANEXO A

### PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Triagem Fitoquímica ou Screening Fitoquímico é considerada mais precisamente a parte preliminar de um trabalho químico sobre uma planta. Sem chegar a detalhes, a triagem procura sistematizar, ou melhor, rastrear os principais grupos de constituintes químicos que compõem um extrato vegetal.

#### 1 Alcalóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 4ml de ácido clorídrico a 1%. Filtrar se necessário. Separar duas porções de 2ml para tubos de ensaio diferentes e adicionar 5 gotas dos reagentes abaixo. A ocorrência de precipitado indica reação positiva.

- Dragendorff

Solução A	Subnitrato de bismuto	0,17g
	Ácido acético glacial	2ml
	Água destilada	8ml
Solução B	Iodeto de potássio	1,6g
	Água destilada	4ml

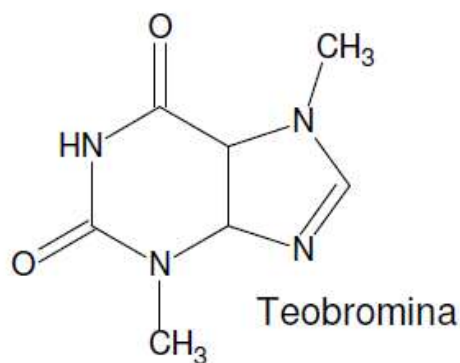
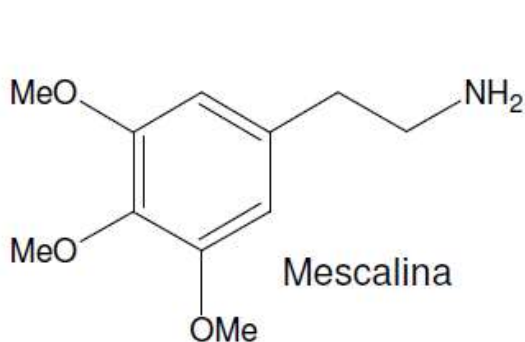
Mistura solução A com solução B. O precipitado tem vermelho tijolo.

- Mayer

Cloreto de mercúrio	280mg
Iodeto de potássio	1g
Água destilada	20ml

O precipitado tem coloração esbranquiçada

Ex.:

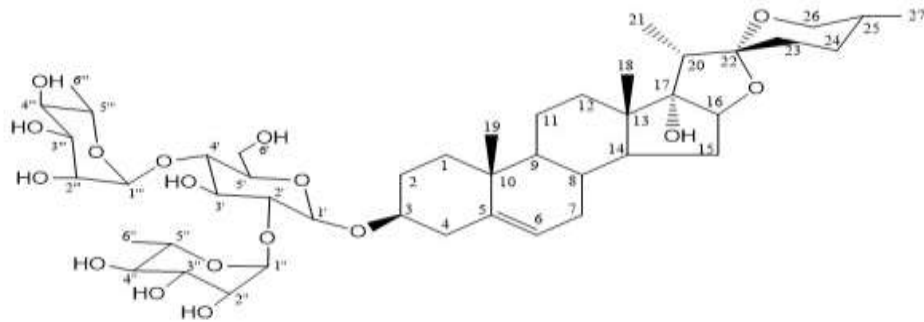




## 2 Saponinas (BARBOSA, 2001)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de água destilada. Agitar vigorosamente em tubo de ensaio por 5 segundos. Deverá formar espuma que permanecerá persistente pelo menos durante 20 minutos, indicando a presença de saponina.

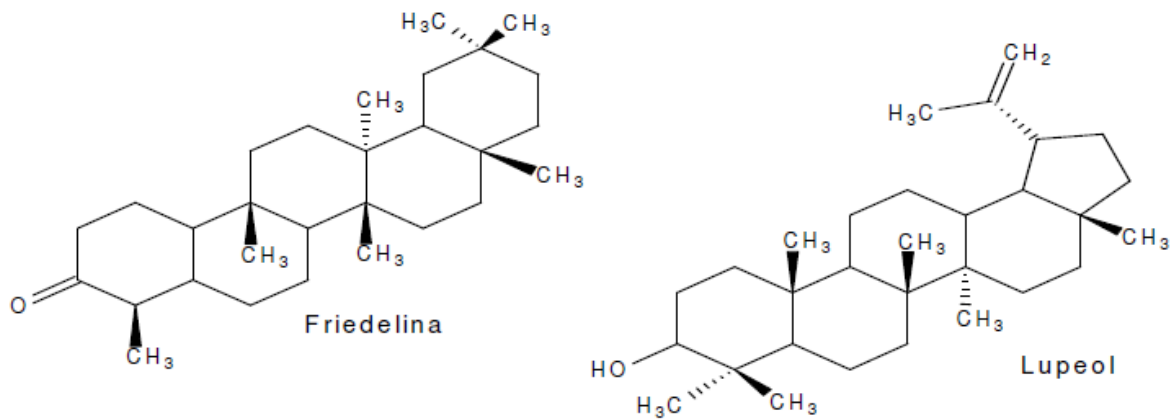
Ex.



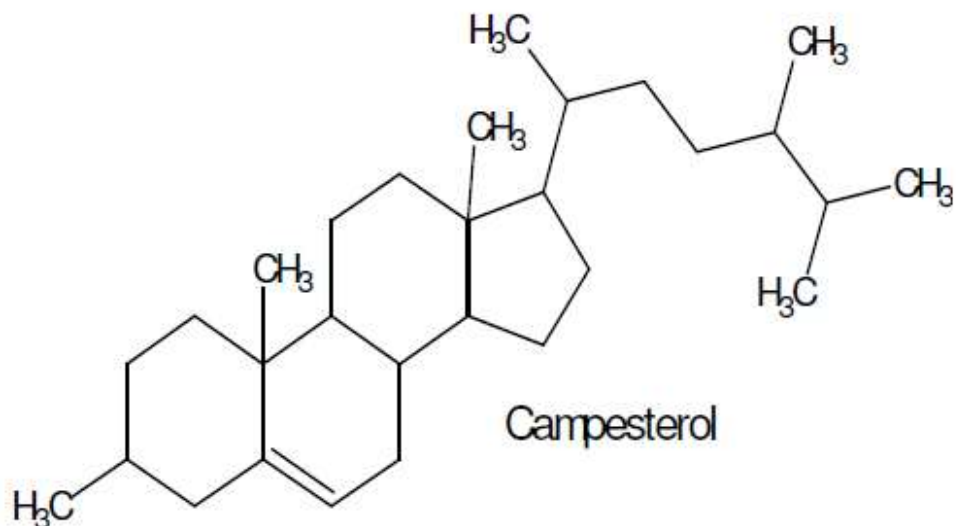
## 3 Esteróides e triterpenóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de clorofórmio. Filtrar se necessário. Juntar 2ml de anidrido acético ao extrato. Agitar suavemente. Pelas paredes do tubo adicionar 1ml de ácido sulfúrico concentrado. No caso de reação positiva, observar-se-á uma sucessão de cores, róseo ao azul e verde.

Ex: triterpenóides



## Ex. Esteróides



### 4 Flavanóides (WALL et al., 1954).

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de metanol. Filtrar se necessário. Adicionar 1ml de ácido clorídrico concentrado. Deixar esta solução reagir com uma fita de magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

### 5 Catequinas (COSTA, 1972)

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 3ml de metanol. Filtrar se necessário. Juntar 1ml de solução de vanilina a 1% e 1ml de ácido clorídrico concentrado. Deixar esta solução reagir com uma fita de magnésio. O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

### 6 Glicosídeos cardíacos (DOMINGUEZ, 1973).

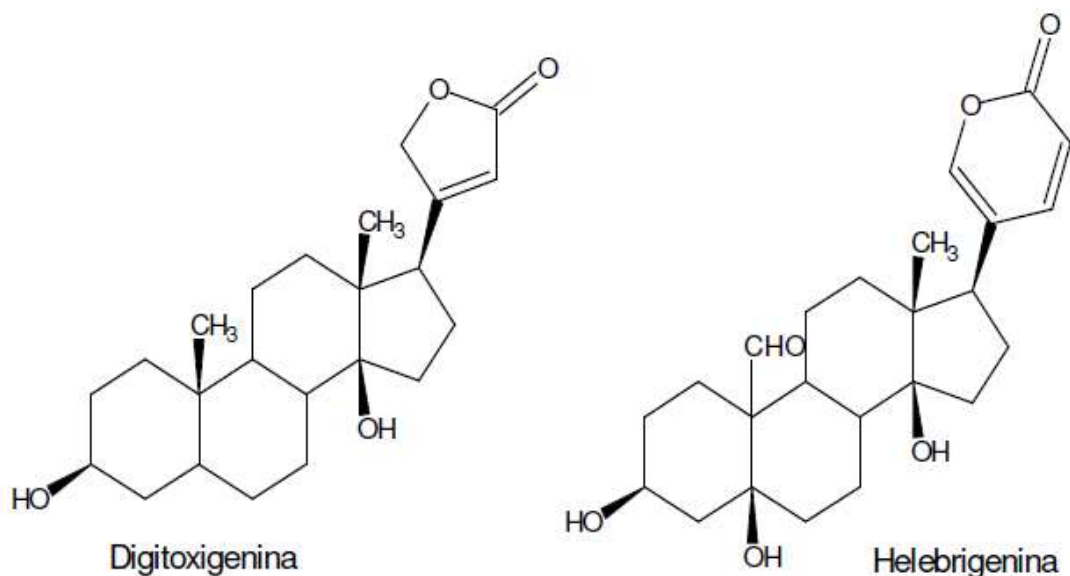
Redissolver alguns miligramas do resíduo em 4ml de metanol. Filtrar se necessário. Separar em 2 porções de 2ml cada e adicionar gotas aos reagentes a seguir:

Reativo de Kedde	Solução I	Acido 3,5-dinitrobenzóico	2g
		metanol	100g
	Solução II	Hidróxido de potássio	0,71g
		Água destilada	18,8ml

No momento da reação juntar partes iguais de I e II. A coloração azul ou violeta indica reação positiva.

Adicionar 3 gotas de solução recente a 5% de nitroprussionato de sódio em água e 3 gotas de hidróxido de sódio 2N. A coloração roxa intensa indica reação positiva.

Ex.:



#### 7 **Sacarídeos** (BARBOSA, 2001).

Num tubo de ensaio, adicionar duas gotas de solução de bórax 1% e duas gotas de solução de fenolftaleína. Produz-se uma coloração rosa. A adição de alguns miligramas do material em estudo sobre esta solução deve ocasionar o desaparecimento da coloração rosa, que reaparece, ao se aquecer, e some novamente ao esfriar.

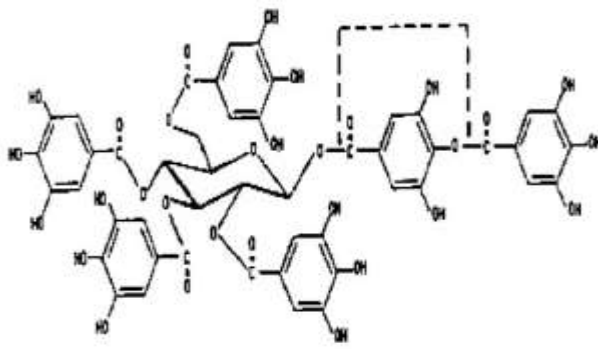
#### 8 **Purinas** (COSTA, 1972).

Numa cápsula de porcelana, juntar alguns miligramas do resíduo, 3 gotas de ácido clorídrico 6N e duas gotas de peróxido de hidrogênio concentrado. Evaporar em banho-maria. Deve-se formar um resíduo vermelho. Juntar 3 gotas de hidróxido de amônia 6N. A coloração violeta indica reação positiva.

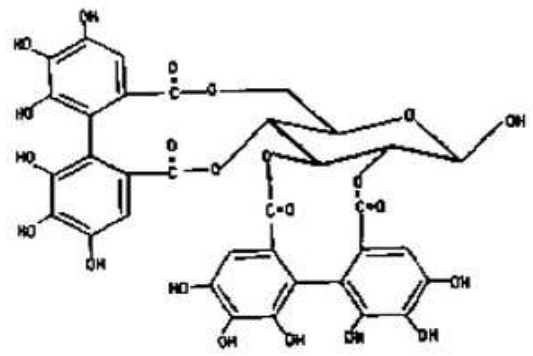
#### 9 **Taninos**

Redissolver alguns miligramas do resíduo em 5ml de água destilada. Filtrar se necessário. Adicionar 4gotas de solução de cloreto férrico a 1%. Aparecimento de uma coloração verde ou azul indica reação positiva.

Ex.:



GALOTANINO



ELAGITANINO