



Extrato de mamona como manipulador da fermentação ruminal

Pâmella Moraes FRANCO¹, Márcia Rodrigues Carvalho OLIVEIRA¹, João Rafael de ASSIS¹,
Jurandy GOUVEIA JÚNIOR¹, Rodrigo de Nazaré Santos TORRES¹, Karine Claudia ALESSI¹,
Adilson Paulo SINHORIN², Jacqueline KERKHOFF², André Soares de OLIVEIRA^{1*}

¹Dairy Cattle Research Lab, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.
(ORCID: 0000-0001-6799-9988; 0000-0001-8321-4394; 0000-0003-0327-2506; 0000-0003-2509-9628;
0000-0002-0453-542X; 0000-0001-5034-9858; *)

²Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, MT, Brasil.
(ORCID: 0000-0002-4133-8994; 0000-0001-5597-1822)

*E-mail: andresoli@ufmt.br (ORCID: 0000-0001-9287-0959)

Recebido em 03/05/2019; Aceito em 07/02/2020; Publicado em 10/04/2020.

RESUMO: Objetivou-se investigar os efeitos da adição do extrato de farelo de mamona (EFM) sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com alto e baixo teor de forragem. Utilizou-se ensaio de incubação ruminal *in vitro* com dois controles, um negativo (sem aditivo) e um positivo (monensina sódica) e EFM liofilizado (20, 40 e 60 mg/frasco). Em condições de alto teor de forragem na dieta, a adição do EFM aumentou o pH do meio e a concentração de acetato, reduziu a produção de gás, mas não afetou a produção de gás por unidade de matéria seca (MS) digerida em relação ao tratamento controle. Em comparação com monensina sódica, o EFM reduziu as concentrações de propionato e amônia e aumentou a produção de gás por unidade de MS digerida. Em condições de baixo teor de forragem, a adição do EFM reduziu o pH e potencial redox do meio em relação ao tratamento controle. Em comparação com a monensina sódica, o EFM reduziu o pH do meio e a produção total de gás, mas não afetou a produção de gás por unidade de MS digerida. O extrato de farelo de mamona destoxificado não apresenta potencial como manipulador da fermentação ruminal.

Palavras-chave: amônia; digestibilidade; eficiência; metano.

Castor bean extract as a manipulator of ruminal fermentation

ABSTRACT: Effects of the castorbean meal extract (CME) on ruminal *in vitro* were investigate in high and low forage diet conditions. For each dietary condition, one *in vitro* ruminal incubation experiment was conducted in a completely randomized design, with nine repetitions per treatment (three animal inoculum donators and three 48 hors-incubations). In high forage diet, CME increased ruminal pH acetate concentration, reduced gas production, but it did not affect the gas production per unit of digested dry matter (DM), in relation to control treatment. Compare to monensin sodium, CME reduced propionate and ammonia concentrations and increased gas production per unit of digested DM, indicating that CME reduces ruminal energetic efficiency. In low forage diet, CME reduced pH and redox potential compare to control. Compare to monensin sodium, CME reduced pH and gas production, but it did not affect gas production per unit of digested DM. Castorbean meal extract does not present potential as manipulator of the ruminal fermentation.

Keywords: ammonia; digestibility; efficiency; methane.

1. INTRODUÇÃO

Os ruminantes, evolutivamente, têm mantido uma relação simbiótica com microrganismos ruminais fornecendo nutrientes e condições físico químicas para o crescimento microbiano, enquanto que a microbiota recompensa degradando componentes dietéticos como carboidratos não fibrosos e fibrosos e, compostos nitrogenados. Os principais produtos desta atividade microbiana incluem os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), proteína microbiana, amônia e gases (CO₂, H₂, O₂ e CH₄). No entanto, alguns desses produtos representam também fontes de perdas de energia e compostos nitrogenados para o animal hospedeiro, como o gás metano (CH₄) e a amônia ruminal, respectivamente. Além disso, a emissão entérica de CH₄/em ruminantes está associada com o passivo ambiental por ser componente dos

gases de efeito estufa (PRIMAVESI et al., 2004; O'MARA, 2011; KNAPP et al., 2014; FAO, 2016).

Assim, os nutricionistas têm buscado através da otimização das formulações de dietas e da utilização de aditivos alimentares, produzir dietas metabolicamente mais eficientes com intuito de modificar o ambiente ruminal e melhorar ou inibir populações microbianas específicas (Assis, 2016). Dentre os aditivos alimentares, os antibióticos ionóforos são os mais utilizados e com razoável sucesso em reduzir a produção de metano, nitrogênio amoniacal e de ácido láctico ruminal (TEDESCHI et al., 2011; APPUHAMY et al., 2013). Porém o uso de antibióticos na dieta de animais tem apresentado baixa aceitação social em razão do potencial de gerar cepas bacterianas resistentes (ASSIS, 2016). Por esta razão, há um grande interesse científico em desenvolver

alternativas que modulem a fermentação ruminal sem que comprometa a saúde animal e humana.

Extratos de plantas podem ser uma alternativa aos antibióticos aditivos alimentares (HART et al., 2008). Diversas plantas contêm compostos secundários que as protegem de ataques de fungos, bactérias, insetos e herbívoros. No entanto, quando níveis elevados dessas substâncias são ingeridos podem ocorrer efeitos adversos sobre o desempenho e saúde do animal, mas, em baixas concentrações, podem ser capazes de melhorar os processos fermentativos no rúmen (BEAUCHEMIN et al., 2008; PEREIRA et al., 2011).

Nosso grupo de pesquisa identificou em estudo preliminar, que o extrato bruto de farelo de mamona destoxificado foi capaz de inibir a produção de amônia ruminal sem afetar o crescimento microbiano (Oliveira et al., 2010), indicando que este extrato poderia ser usado como manipulador da fermentação ruminal. Todavia, estudos confirmatórios avaliando o efeito sobre a fermentação ruminal em diferentes dietas são necessários. Em estudo mais recente, realizado também em nosso laboratório, foi observado que o extrato de mamona aumentou a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (MS) e a produção de metano/por unidade de MS digerida em dietas com alto teor de forragem, mas não afetou a produção de AGCC, lactato, e a população de protozoários ciliados (ASSIS, 2016). Porém, o estímulo da adição do extrato de mamona na fermentação ruminal ocorreu por efeito nutricional via aumento no fornecimento de nitrogênio, uma vez que não foi feito ajustamento na adição de nitrogênio para fornecimento isonitrogenado entre os tratamentos (ASSIS, 2016). Desta forma, os efeitos do extrato de farelo de mamona na fermentação ruminal ainda não foram elucidados. Objetivou-se investigar os efeitos da adição do extrato de mamona sobre o perfil da fermentação ruminal *in vitro* em dietas com alto e baixo teor de forragem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nas dependências do Dairy Cattle Research Lab da Universidade Federal do Mato Grosso, Campus Sinop. Foram utilizados três ovinos fistulados no rúmen (peso corporal de 39 ± 6 kg) e mantidos em uma baía contendo cochos para fornecimento das dietas, de sal mineral e bebedouros. Os procedimentos experimentais sucederam de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFMT (Processo N° 23.108.718652/2016-77).

O extrato bruto do farelo de mamona foi obtido em um volume total de 250 mL conforme desenvolvido por Oliveira et al. (2010), volume considerado suficiente para posterior obtenção do extrato seco necessário para o experimento. O extrato bruto na forma líquida foi então congelado em ultra freezer e submetido à liofilização para utilização no ensaio *in vitro*.

Os efeitos da adição do extrato bruto de farelo de mamona sobre a fermentação ruminal foram avaliados em dois experimentos de fermentação ruminal *in vitro*, com diferentes teores de forragem nas dietas dos animais e substratos microbianos (Experimento 1, alto teor de forragem: 880 g de forragem/kg de matéria seca (MS); Experimento 2, baixo teor de forragem: 150 g de

forragem/kg de MS; Tabela 1). As dietas e os substratos (mesma composição de ingredientes) foram formulados para conter 17% de proteína bruta (base da MS). Os ingredientes foram pré-secos em estufa de ventilação forçada (55 °C) por 72 horas e moídos em moinho tipo Wiley em peneira de 1 mm de diâmetro./Amostras de feno, ingredientes concentrados (farelo de soja e milho) e extrato de mamona liofilizado foram analisados quanto as concentrações de matéria seca (método N° 934.01) e proteína bruta (PB, método N° 954.01) de acordo com a AOAC (2005).

Cada experimento teve duração aproximada de 60 dias, sendo 30 dias de adaptação dos animais às dietas e o restante para as três incubações *in vitro* de 48 horas, utilizando-se conteúdo ruminal dos animais adaptados como inóculo. Os animais receberam as dietas duas vezes ao dia, permitindo-se sobras equivalentes a 5% da quantidade ofertada. Cada experimento de incubação ruminal *in vitro* foi conduzido/em delineamento em blocos casualizados, utilizando um controle negativo (sem aditivo), um controle positivo (monensina sódica na dose de 30 mg/kg MS de substrato; Rumensin® 100 monensina sódica, Elanco, EUA) e três doses de extrato de mamona (20, 40 e 60 mg/frasco de incubação). A unidade experimental foi representada por uma incubação *in vitro* de 48 horas por inóculo-animal. Foram utilizadas nove repetições por tratamento (três incubações de 48 horas × inóculo de três animais) em cada experimento.

Foi implantado um sistema semiautomático de fermentação ruminal *in vitro*, em batelada de cultura mista microbiana obtida do conteúdo ruminal. Os frascos de incubação (160 mL) foram mantidos em banho-maria (HH Banho Maria Digital, Edulab, Bexwell, UK) com temperatura de 39 °C. Nos frascos foram adicionados os substratos (Tabela 1), os diferentes aditivos (monensina ou extrato de mamona com diferentes doses), a caseína, o meio de cultivo e o inóculo ruminal nas quantidades descritas na Tabela 2. Como o extrato bruto liofilizado continha 7,18 g de nitrogênio/kg de matéria natural, foi necessário adicionar caseína nos frascos de incubação para manter o aporte isonitrogenado entre os tratamentos (Tabela 2) e evitar o efeito de confundimento ocorrido em Assis (2016).

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas/substrato microbianos utilizados nos experimentos I (alto teor de forragem) e II (baixo teor de forragem).

Table 1. Proportion of ingredients and chemical composition of microbial diets / substrate used in experiments I (high forage content) and II (low forage content).

Ingredientes	Experimentos	
	I	II
Ingredientes (g/kg de matéria seca, MS)		
Feno de tifton-85	88,00	15,00
Milho grão		67,00
Farelo de soja	12,00	18,00
Composição química		
Matéria seca (g/kg)	863.5	878.2
Proteína bruta (g/kg MS)	176.9	176.5
Fibra em detergente neutro (g/kg MS)	596.2	188.2

Composição química por quilograma (Kg) de mistura mineral: Ca 150 g, P 65 g, Na 107 g, S 12 g, Mg 6000 mg, Co 175 mg, Cu 100 mg, I 175 mg, Mn 1440 g, Se 27 mg, Zn 6000 mg, Fe 1000 mg, F 650 mg. A mistura mineral foi fornecida *ad libitum* em cocho de sal mineral.

Em cada incubação de cada experimento, foram implantados três conjuntos de incubação simultâneos, sendo

um conjunto para cada inóculo de animal. Cada conjunto foi formado por 12 frascos de vidro de 160 mL, contendo os cinco tratamentos em duplicata e mais dois frascos de branco (sem substrato). As mensurações do pH, potencial redox, produção cumulativa de gases foram realizadas em todos os frascos. Metade dos frascos (seis de cada conjunto, sendo um de cada tratamento e um branco) foram utilizados para avaliar os teores de AGCC e amônia e contagem de protozoários ciliados. A outra metade foi utilizada para avaliar a digestibilidade *in vitro* da MS por método gravimétrico.

Um dia antes de cada incubação, os substratos (500 mg), os aditivos e o meio de cultivo foram adicionados aos frascos e mantidos à 4 °C. O meio utilizado foi composto pelas soluções tampão, macro e micromineral, caseína, água destilada, cisteína, sulfato de sódio em substituição ao sulfato de sódio conforme Rothe; Thomm (2000) (Tabela 2) e preparado para manter o pH entre 6,8 a 7,0. O inóculo ruminal dos animais foi coletado duas horas após a alimentação matinal, de diferentes regiões do rúmen, sendo a fase líquida removida da sólida por sacos de tecido. Após a coleta da amostra composta de conteúdo sólido ruminal, a fase líquida foi filtrada em quatro camadas de gaze e mantido a 39 °C por 10 minutos em repouso em frasco transparente com infusão contínua de CO₂. Após este procedimento, o líquido da fase mediana do frasco foi utilizado como inóculo. Em seguida o inóculo foi adicionado aos frascos, preparados previamente com CO₂, utilizando seringa e agulha hipodérmica (40 x 12 mm; (18G x 1 1/2")) e mantidos à temperatura de 39 °C em banho-maria para fermentação durante 48 horas.

A produção total de gases após 48 horas foi mensurada utilizando sistema semiautomático (THEODOROU et al., 1994), por meio de transdutor de pressão (Modelo DPI 705 Series Digital; Marca GE, Leicester, Inglaterra) para aferir a pressão absoluta em mega pascal (MPa). O volume total de gás foi estimado por meio de uma equação ajustada previamente no laboratório (ASSIS, 2016); volume de gás (mL) = 0,2291 + 994,43 × MPa; R² = 0,989; n = 343).

Imediatamente após a mensuração da produção total dos gases, foram mensurados o pH e potencial redox em todos os frascos (HI 2221-Calibration Check pH/ORP Meter, HANNA Instruments, Woonsochet, RI, USA). Em cada

frasco de fermentação utilizado para análises de AGCC, amônia e contagem de protozoários; foram coletadas três amostras/frasco: A primeira de 1,5 mL foi transferida para tubo de microcentrífuga de 2 mL contendo 200 µL de ácido tricloroacético (concentração de 10%) e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos (3400 Excelsa®Flex, FANEM LTDA, Guarulhos, SP, Brasil). O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e congelado a -20 °C para análise de nitrogênio amoniacal por espectrofotometria usando método do indofenol (Weatherburn, 1967). A segunda amostra de 6,0 mL foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 150 µL de ácido sulfúrico (concentração de 50%) e centrifugado a 14.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga e congelado a -20 °C, para análise da concentração de ácidos graxos voláteis. Finalmente, a terceira amostra de 2,0 mL de conteúdo do frasco de fermentação foi armazenada em frasco contendo 2 mL de solução formaldeído (concentração de 50%) e congelados a -20 °C para contagem de protozoários conforme técnica de Dehority (1984) com fixação em solução de lugol como descrito por D'Agosto; Carneiro (1999).

As análises de AGCC foram feitas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE analítica foi realizada num sistema de CLAE Varian Pro Star 325 LC com detector ultravioleta (UV), com sistema de duplo comprimento de onda. O sistema de separação foi constituído de coluna de fase reversa C18 Supelco (250,0 x 4,6 mm, 5 µm). A eluição foi feita: de fase móvel isocrática constituída por solução aquosa de HPO₃, com pH ajustado para 2,5 (eluente A) e acetonitrila (eluente B). O gradiente foi de 92% de A e 8% de B, com fluxo de 1 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 8 minutos. O volume de injeção de 20 µL e detecção em 210 nm. A quantificação foi obtida por curva de calibração com uso de padrões externos.

Nos frascos destinados à avaliação da digestibilidade, o conteúdo de cada frasco foi filtrado em filtros de papel quantitativo de rápida filtração (previamente secos em estufas à 55 °C por 24 horas e pesados) lavados com água destilada e seco em estufa a 55 °C por 72 horas e posteriormente pesado para quantificação gravimétrica da digestibilidade *in vitro* da MS.

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

Table 2. Ratio of substrate, additive (monensin or castor bean extract), ruminal inoculum and culture medium used in each 160 mL vial.

Item	Sem aditivo	Monensina sódica (30 mg/kg substrato)	Extrato de mamona (mg)		
			20	40	60
Substrato ¹ , mg de MS	500	500	500	500	500
Monensina sódica ² , mg		0,015			
Extrato de mamona ³ , mg			20	40	60
Caseína ⁴ , mg	27	27	18	9	
Inóculo ruminal, mL	15	15	15	15	15
Meio ⁵ , mL	30	30	30	30	30

¹ Conforme Tabela 1; ²Rumensin® 100, 10 g monensina sódica/100 gramas, Elanco, EUA; ³ Extrato bruto liofilizado de farelo de mamona submetido à tratamento alcalino (Oliveira et al., 2010), contendo 7,18% de nitrogênio, base da matéria natural; ⁴ Caseína foi utilizada para adicionar a mesma quantidade de nitrogênio por frasco de fermentação; ⁵ Caseína 2,5 g/L, NH₄HCO₃ 1g/L, NaHCO₃ 8,8 g/L, Na₂HPO₄.H₂O 1,65 g/L, KH₂PO₄ 1,65 g/L, MgSO₄.7H₂O 0,15 g/L, CaCl₂.2H₂O 0,016 g/L, MnCl₄.4H₂O 0,012 g/L, CoCl₂.6H₂O 0,0013 g/L, FeCl₃ 0,01 g/L, Resarzurina 1,25 mg/L, Cisteína HCl 0,315 g/L, Na₂SO₃ 0,315 g/L.

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

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + I_k + A_i \times I_i + e_{ijk} \quad (01)$$

sendo: Y_{ijk}=resposta experimental medida referente ao efeito do tratamento i, no animal j, na incubação k; μ = constante geral; T_i = efeito fixo ao tratamento i, onde i = 1, 2, 3, 4 e 5;

A_j = efeito aleatório do animal doador de inóculo ruminal j , onde $j = 1, 2$; I_k = efeito aleatório da incubação I , sendo $k = 1, 2$ e 3 ; $A_i \times I_i$ = efeito aleatório da interação entre o animal doador de inóculo ruminal e incubação;

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

Os efeitos de tratamentos foram decompostos em quatro contrastes: efeito do uso de extrato de mamona (controle *vs* extrato de mamona 20, 40 e 60 mg); efeito de fonte de aditivo (monensina *vs* extrato de mamona 20, 40 e 60 mg); efeito linear da dose de extrato de mamona (20, 40 e 60 mg) e efeito quadrático da dose de extrato de mamona (20, 40 e 60 mg). Adotou-se nível crítico de 0,05 de probabilidade para o erro tipo I. Valores de erro tipo I entre 0,05 a 0,10 foram interpretados como tendência.

3. RESULTADOS

Em dietas com alto teor de forragem, a adição do extrato de farelo de mamona aumentou o pH final do meio ($P < 0,04$), mas não afetou potencial redox ($P = 0,20$), a digestibilidade *in vitro* da MS ($P = 0,17$), a contagem de protozoários ciliados ($P = 0,89$), as concentrações de propionato ($P = 0,54$) e butirato ($P = 0,53$) em relação ao controle (Tabela 3). Todavia, a adição do extrato de mamona aumentou a concentração de acetato ($P = 0,03$) e tendeu a reduzir a concentração de amônia ($P = 0,09$). Além disso, a adição do extrato de mamona reduziu a produção total de gás ($P < 0,01$), mas não afetou a produção total de gás por unidade de MS digerida em relação ao controle (Tabela 3), indicando ausência de efeito sobre a eficiência de fermentação ruminal.

Em comparação com monensina sódica, o extrato de mamona não afetou o pH final do meio ($P = 0,31$), o potencial oxí-redução ($P = 0,31$), a digestibilidade *in vitro* da MS ($P = 0,38$), a contagem de protozoários ciliados ($P = 0,78$), as concentrações de acetato ($P = 0,52$) e butirato ($P =$

0,34) no meio, mas reduziu as concentrações de propionato ($P = 0,03$), amônia ($P < 0,01$) e a produção total de gás por unidade de MS digerida, em condições de alto teor de forragem (Tabela 3). A dose de extrato de mamona não afetou ($P > 0,10$) as variáveis de fermentação ruminal em condições de alto teor de forragem, exceto para concentração de amônia que reduziu linearmente ($P = 0,02$) com aumento da dose de extrato de mamona (Tabela 3).

Em condições de baixo teor de forragem na dieta, a adição do extrato de mamona reduziu o pH final do meio ($P = 0,02$) e o potencial oxí-redução ($P < 0,01$), e tendeu a reduzir ($P = 0,10$) a população de protozoários ciliados em relação ao controle (Tabela 4). Todavia, estes efeitos não foram suficientes para impactar a digestibilidade *in vitro* da MS ($P = 0,59$), as concentrações de acetato ($P = 0,25$), propionato ($P = 0,69$), butirato ($P = 0,68$) e amônia ($P = 0,92$), produção total de gás ($P = 0,18$) e produção total de gás por unidade de MS digerida ($P = 0,72$) em relação ao controle (Tabela 4).

Em comparação com monensina sódica, o extrato de mamona reduziu o pH final do meio ($P = 0,05$), a concentração de acetato ($P = 0,03$) e a produção total de gases ($P = 0,04$), mas não afetou o potencial oxí-redução ($P = 0,11$), a digestibilidade *in vitro* da MS ($P = 0,52$), a contagem de protozoários ciliados ($P = 0,19$), as concentrações de propionato ($P = 0,87$), butirato ($P = 0,27$) e amônia ($P = 0,11$) no meio, e a produção total de gás por unidade de MS digerida ($P = 0,14$), em condições de baixo teor de forragem (Tabela 4).

A dose de extrato de mamona não afetou ($P > 0,10$) as variáveis de fermentação ruminal em condições de baixo teor de forragem, exceto a produção total de gás que apresentou comportamento quadrático ($P = 0,02$) com aumento da dose de extrato de mamona, com maior valor observado na dose de 40 mg de extrato por frasco (Tabela 4). Todavia, a dose de extrato de mamona não afetou a produção total de gás por unidade de MS digerida ($P = 0,14$), indicando ausência de efeito sobre a eficiência de fermentação ruminal (Tabela 4).

Tabela 3. Efeito da adição do extrato de mamona sobre a fermentação ruminal (48 horas) *in vitro* em dietas com alto teor forragem (experimento I).

Table 3. Effect of the addition of castor bean extract on ruminal fermentation (48 hours) *in vitro* in high forage diets (experiment I).

Item	Sem aditivo	Monensina	Extrato de mamona (mg/frasco)			EPM ²	Contrastes (Valor- P) ³			
			20	40	60		1	2	3	4
pH final	6,49	6,58	6,52	6,56	6,55	0,03	0,04	0,31	0,31	0,46
Potencial oxí-redução, mV	-271	-272	-263	-267	-263	7,4	0,20	0,28	0,92	0,46
DIVMS 48 h, g/100g ¹	49,2	46,5	48,8	47,6	46,8	2,91	0,16	0,38	0,13	0,84
Protozoários ciliados, 10 ³ /mL	127	119	127	140	127	42	0,89	0,78	0,99	0,72
Acetato, μ mol/mL	29,7	30,6	30,9	31,3	31,5	1,78	0,03	0,52	0,53	0,92
Propionato, μ mol/mL	8,2	9,0	7,7	7,5	7,4	0,51	0,15	0,03	0,64	0,99
Butirato, μ mol/mL	8,2	8,1	7,9	6,6	7,4	0,53	0,17	0,34	0,52	0,12
N-NH ₃ , mg/dL	23,6	25,4	23,8	21,9	21,8	1,66	0,09	<0,01	0,02	0,20
Produção total gás (PTG), mL	53,9	45,0	49,3	46,7	50,7	3,26	<0,01	0,13	0,61	0,10
PTGmL/g MS digerida	221,7	120,3	197,8	198,4	218,9	16,57	0,29	<0,01	0,30	0,55

¹ DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca. ² EPM = erro padrão da média. ³ 1 = controle *versus* 20, 40 e 60 mg de extrato de mamona; 2 = monensina/*versus* 20, 40 e 60 mg de extrato de mamona; 3 =efeito linear da dose de extrato de mamona; 4 =efeito quadrático da dose de extrato de mamona.

4. DISCUSSÃO

Nossa hipótese de que o extrato de farelo de mamona pode ser usado como manipulador da fermentação ruminal (OLIVEIRA et al., 2010) em dietas com alto ou baixo teor de forragem não foi confirmada. Assis (2016) em estudo semelhante ao presente experimento, observou que o extrato

de mamona aumentou a digestibilidade *in vitro* da MS e a produção de metano/por unidade de MS digerida em dietas com alto teor de forragem, mas não afetou a produção de AGCC, lactato e a população de protozoários ciliados. Todavia, o estímulo da adição do extrato de mamona na fermentação ruminal observado por Assis (2016) ocorreu por

efeito nutricional via aumento no fornecimento de nitrogênio, uma vez que não foi feito ajuste na adição de nitrogênio para fornecimento isonitrogenado entre os tratamentos, diferente ao procedimento no presente estudo. Como no nosso estudo o fornecimento de nitrogênio (via extrato bruto de mamona) foi balanceado através da adição

de caseína, o efeito de confundimento obtido em Assis (2016) foi anulado, o que permitiu isolar os efeitos dos diferentes aditivos e verificar que a adição do extrato de mamona em tratamentos isonitrogenados não afetou a digestibilidade da MS.

Tabela 4. Efeito da adição do extrato de mamona sobre a fermentação ruminal (48 horas) *in vitro* em dietas com baixo teor forragem (experimento II).

Table 4. Effect of castor bean extract addition on *in vitro* ruminal fermentation (48 hours) in low forage diets (experiment II).

Item	Controle	Monensina	Extrato de mamona (mg/frasco)			EPM ²	Contrastes (Valor-P) ³			
			20	40	60		1	2	3	4
			pH final	6,09	6,06		6,01	6,02	5,98	0,09
Potencial oxi-redução, mV	-299	-286	-279	-284	-275	14,5	<0,01	0,11	0,39	0,12
DIVMS 48 h, g/100g ¹	68,9	64,3	66,7	67,2	66,3	8,89	0,59	0,51	0,93	0,86
Protozoários ciliados, 10 ³ /mL	553	328	513	394	371	122	0,10	0,19	0,12	0,54
Acetato, µmol/mL	40,2	45,9	42,8	41,4	42,2	2,50	0,25	0,03	0,77	0,51
Propionato, µmol/mL	18,3	18,0	17,4	18,1	18,0	3,55	0,69	0,87	0,68	0,79
Butirato, µmol/mL	14,7	15,6	13,8	15,2	13,6	1,67	0,69	0,27	0,90	0,26
N-NH ₃ , mg/dL	29,0	34,0	31,7	29,7	26,5	3,15	0,92	0,11	0,15	0,86
Produção total gás, mL	73,3	76,2	69,6	74,4	60,7	4,77	0,18	0,04	0,05	0,02
Produção total gás mL/g MS digerida	226,1	254,9	228,6	228,6	189,5	38,6	0,72	0,14	0,23	0,50

¹ DIVMS = digestibilidade *in vitro* da matéria seca; ² EPM = erro padrão da média; ³ 1 = controle *versus* 20, 40 e 60 mg de extrato de mamona; 2 = monensina *versus* 20, 40 e 60 mg de extrato de mamona; 3 =efeito linear da dose de extrato de mamona; 4 =efeito quadrático da dose de extrato de mamona.

Embora a adição de extrato de farelo de mamona tenha aumentado o pH e a concentração de acetato, reduziu a produção total de gás e tendeu a reduzir a concentração de amônia em relação ao controle em condições de alto teor de forragem. A ausência de efeito sobre a produção total de gás por unidade de MS digerida indica que o extrato de farelo de mamona não é efetivo em alterar a eficiência de fermentação ruminal. A produção total de gás por unidade de MS digerida pode ser considerada um indicador de eficiência energética da fermentação, pois a produção total de gás representa uma fonte de perda de carbono (HACKMANN; FIRKINS, 2015). Assim, esta medida representa uma variável indireta de perdas de carbono por unidade de massa fermentada.

Embora a dose de 40 mg de extrato de mamona/frasco tenha permitido maximizar a produção total de gases, a ausência de efeito da dose sobre a produção de gases por unidade de MS digerida também indicou ausência de efeito da dose sobre a eficiência de utilização de energia digestível pelos microrganismos ruminais.

O uso do extrato de mamona reduz a concentração de propionato e aumenta a produção de gases por unidade de MS digerida em relação à monensina sódica em dietas de alta forragem, indicando que o extrato de mamona reduz a capacidade de fermentação glicogênica ruminal (HALL; MERTENS, 2017) e a eficiência de utilização de energia digestível pelos microrganismos ruminais. Assim, o extrato de mamona não pode ser considerado como potencial aditivo capaz de modular a fermentação ruminal para propiciar melhoria na eficiência energética da fermentação ruminal, na utilização de compostos nitrogenados e/ou no maior aporte de ácidos graxos voláteis glicogênicos para o animal hospedeiro.

5. CONCLUSÕES

O extrato bruto de mamona destoxificado, independente da dose (20, 40 ou 60 mg/500 mg de substrato), não afeta a digestibilidade *in vitro* da MS, o perfil de ácidos graxos

voláteis, a produção de amônia, a produção total de gases e a produção de gases/por unidade de MS digerida em dietas com alto ou baixo teor de forragem. Assim, o extrato bruto de mamona não apresenta potencial de uso como manipulador da fermentação ruminal.

6. AGRADECIMENTOS

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

7. REFERÊNCIAS

- AOAC (2005) Official Methods of Analysis, 18th Ed. Arlington, VA, USA: AOAC International.
- APPUHAMY, J. A. D. R. N.; STRATHE, A. B.; JAYSUNDARA, S.; WAGNER-RIDDLE, C.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J.; KEBREAB, B. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 6, p. 5161-5173, 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5923>
- ASSIS, J. R. **Extrato de planta como manipulador da fermentação ruminal**. 2016. 43f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Mato Grosso, Sinop, 2016.
- BEAUCHEMIN, K. A.; KREUZER, M.; O'MARA, F. E.; MCALLISTER, T. A. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 48, n. 2, p. 21–27, 2008. DOI: <https://dx.doi.org/10.1071/EA07199>

- D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M. E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, v. 16, n. 3, p. 725-729, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81751999000300011>
- DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p.182-185, 1984.
- FAO_FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Reducing Enteric Methane for improving food security and livelihoods. 2016.** Disponível em: <<http://www.fao.org/in-action/enteric-methane/background/why-is-enteric-methane-important/en/>>. Acesso em: 02 de Abril de 2019.
- HACKMANN, T. J.; FIRKINS, J. L. Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-16, 2015. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00465>
- HALL, M. B.; MERTENS, D. R. A 100-Year Review: Carbohydrates – Characterization, digestion, and utilization. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 12, p. 10078-10093, 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13311>
- HART, K. J.; YÁÑEZ-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. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007>
- KNAPP, J. R.; LAUR, G. J.; VADAS, P. A.; WEISS, W. P.; TRICARICO, J. M. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, p. 3231-3261, 2014. DOI: <https://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7234>
- PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. S.; LIMA, M. A. de; BERCHIELLI, T. T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 277-283, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000300011>
- O' MARA, F. P. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 7-15, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.04.074>
- OLIVEIRA, A. S.; OLIVEIRA, M. R. C.; CAMPOS, J. M. S.; LANA, R. P.; MACHADO, O. L. T.; RETAMAL, E.; DETMANN; E.; VALADARES FILHO, S. C. In vitro ruminal degradation of ricin and its effect on microbial growth. **Animal Feed Science and Technology**, v. 157, n. 1-2, p. 41-54, 2010. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.01.006>
- PEREIRA, L. G. R.; MACHADO, F. S.; CAMPOS, M. M.; GUIMARÃES JUNIOR, R.; TOMICH, T. R.; MOREIRA, E. de A. Avanço conceitual em diagnóstico e estratégias de mitigação de metano entérico em bovinos de leite no Brasil. In: MARCONDES, M. I. (Ed.) **Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira**. Viçosa: UFV, 2011, p. 75-122.
- ROTHER, O. E.; THOM, M. A simplified method for the cultivation of extreme anaerobic Archaea based on the use of sodium sulfite as reducing agent. **Extremophiles**, Tokyo, v. 4, p. 247-252, 2000. DOI: <https://dx.doi.org/10.1007/PL00010716>
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967. DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/ac60252a045>
- TEDESCHI, L. O.; CALLAWAY, T. R.; MUIR, J. P.; ANDERSON, R. C. Potential environmental benefits of feed additives and other strategies for ruminant production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 291-309, 2011.
- THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185-197, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)