



**EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE SERIGUELA
(*Spondias purpurea* L.) NA MODULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO
RUMINAL *IN VITRO***

EDUARDO HENRIQUE SANTOS DE LIMA



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE SERIGUELA (*Spondias purpurea* L.) NA MODULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

Autor: Eduardo Henrique Santos de Lima
Orientador: Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Maio, 2026

EDUARDO HENRIQUE SANTOS DE LIMA

EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE SERIGUELA (*Spondias purpurea* L.) NA MODULAÇÃO DA FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira

Co-orientadora: Profa. Dra. Gabriele Marisco da Silva

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Maio, 2026

636.085 Lima, Eduardo Henrique Santos de.
L697e Extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) na modulação da fermentação ruminal *in vitro*. / Eduardo Henrique Santos de Lima. – Itapetinga-BA: UESB, 2026.

75p.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Área de Concentração em Produção de Ruminantes. Sob a orientação do Prof. D. Sc. Márcio dos Santos Pedreira e coorientação da Profª D. Sc. Gabriele Marisco da Silva.

1. Extrato etanólico – Folhas de seriguela – Aditivo alimentar. 2. Seriguela – Extrato etanólico – Fermentação Ruminal. 3. Fermentação ruminal *in vitro* – Extrato vegetal. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pedreira, Márcio dos Santos. III. Silva, Gabriele Marisco da. IV. Título.

CDD (21): 636.085

Catálogo na Fonte:
Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Fermentação ruminal – Compostos secundários – Modulação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Área de Concentração: Produção de Ruminantes

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) na modulação da fermentação ruminal *in vitro*”.

Autor: Eduardo Henrique Santos de Lima

Orientador: Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira

Coorientador: Profa. Dra. Gabriele Marisco da Silva

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA,
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **MARCIO DOS SANTOS PEDREIRA**
Data: 08/05/2026 16:32:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Márcio dos Santos Pedreira – UESB

Documento assinado digitalmente
 **GABRIELE MARISCO DA SILVA**
Data: 08/05/2026 16:13:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Gabriele Marisco da Silva – UESB

Documento assinado digitalmente
 **LIGIA LINS SOUZA**
Data: 08/05/2026 18:28:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Lígia Lins Souza – UESB

Documento assinado digitalmente
 **MAURICIO CIVIERO**
Data: 08/05/2026 17:19:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Maurício Civiero – UESB

Documento assinado digitalmente
 **BRUNO LOPES BASTOS**
Data: 08/05/2026 17:12:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Bruno Lopes Bastos – UFBA

Data de realização: 08 de maio de 2026.

“Sempre parece impossível, até que seja feito.”

(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser fortaleza nos dias difíceis, guia nos momentos de incerteza e sustento ao longo de toda esta caminhada; com Ele, tudo foi possível. Gratidão.

Aos meus pais, Edvaldo e Maria Luíza, pelo amor incondicional, pela compreensão, dedicação e pelas orações diárias, que sempre foram alicerces fundamentais em minha trajetória.

Aos meus irmãos, Gustavo e Diego, pelo amor, companheirismo e incentivo constante.

Às minhas tias, Lourdes e Fátima, por toda ajuda, cuidado, palavras de apoio e sustento oferecidos ao longo do caminho.

Às minhas primas, Meriellen e Gabriellen, pela ajuda, carinho e presença nos momentos importantes.

À minha namorada, Jamile, por ser presença, cuidado e abrigo ao longo desta caminhada.

Aos meus amigos da Paraíba, que, mesmo longe, nunca deixaram de se fazer presentes.

Aos amigos e integrantes do GPAS-LNA, pela contribuição excepcional em todas as fases da pesquisa e pela constante disponibilidade em colaborar.

Ao professor Márcio dos Santos Pedreira, pela orientação, dedicação e valiosas contribuições no desenvolvimento do experimento e das análises.

Aos funcionários, Adriano, Gil, Zé Queiroz, Daniel e Almir pela ajuda, apoio técnico e colaboração durante a execução deste trabalho.

À Dra. Ana Paula, pela disponibilidade e ajuda na execução das análises.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), por proporcionar e contribuir para minha realização profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ), pela oportunidade de formação acadêmica e por ser difusor de conhecimento científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a realização dos estudos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

BIOGRAFIA

EDUARDO HENRIQUE SANTOS DE LIMA, filho de Maria Luíza Santos de Lima e Edvaldo Roseno de Lima, nasceu em Areia, estado da Paraíba, em 9 de março de 1993. Em 2012, ingressou no curso de Zootecnia e, três anos depois, migrou para o curso de Medicina Veterinária, ambos na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), concluindo a graduação em 2020. No mesmo ano, deu continuidade à sua formação acadêmica ao ingressar no Mestrado em Ciência Animal pela Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), com atuação na área de Produção de Ruminantes. Paralelamente, realizou especialização em Manejo de Pastagens e Nutrição de Ruminantes pela Faculdade Associadas de Uberaba (FAZU). Em março de 2022, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, na área de concentração Produção de Ruminantes, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMO GERAL	XIV
GENERAL ABSTRACT.....	XV
I - REFERENCIAL TEÓRICO	1
1.1.Introdução geral.....	1
1.2.Fermentação Ruminal: fundamentos e desafios	3
1.3.Uso de ionóforos (monensina) e limitações	5
1.4. Alternativas naturais: metabólitos secundários	6
1.4.1 Taninos	6
1.4.2 Saponinas.....	8
1.4.3 Óleos essenciais.....	9
1.4.4 Flavonoides.....	11
1.4.5 Alcaloides	12
1.5 Ionóforos e metabólitos secundários na modulação da fermentação ruminal	13
1.6 Referências bibliográficas	15
II – OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
III - CAPÍTULO I.....	21
Abstract.....	22
Introduction	23
Materials and methods.....	24
Results and discussion	28
Conclusion.....	35
References	36
IV - CAPÍTULO II	43
Resumo	43
Abstract.....	44
1. Introdução.....	45

2. Material e métodos	46
3. Resultados e discussão	51
4. Conclusão	68
5. Referências bibliográficas	69
V - CONCLUSÃO GERAL	75

LISTA DE TABELAS

III - CAPÍTULO I

Table 1. Chemical composition of ingredients and experimental diet	25
Table 2. Estimated <i>in vitro</i> gas production parameters for control, extract, and monensin treatments.	28
Table 3. Apparent dry matter degradability (g kg^{-1} DM) over incubation time for control, extract, and monensin treatments.	32
Table 4. Ruminal pH values over the incubation period for control, extract, and monensin treatments	33

IV - CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química dos ingredientes e da ração experimental.....	47
Tabela 2. Parâmetros ruminais <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L. ou monensina sódica.....	53
Tabela 3. Parâmetros do modelo de degradabilidade da matéria seca <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L. ou monensina sódica.....	58
Tabela 4. Degradabilidade da fibra em detergente neutro (FDN) <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L. ou monensina sódica.....	62
Tabela 5. Parâmetros da cinética de degradação de carboidratos <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L. ou monensina sódica, estimados pela técnica de produção cumulativa de gases.....	64

LISTA DE FIGURAS

III - CAPÍTULO I

Figure 1. Cumulative gas production (mL) over 72 h of <i>in vitro</i> fermentation for extract, monensin, and control treatments.....	31
Figure 2. Dry matter degradability (g kg^{-1} DM) throughout fermentation time (72 h) for control, extract, and monensin treatments	33
Figure 3. Ruminant pH values over the fermentation period (72 hours) for control, extract, and monensin treatments.....	35

IV - CAPÍTULO II

Figura 1. Valores do pH ao longo de 96 horas de fermentação <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L.....	51
Figura 2. Valores de propionato ao longo de 96 horas de fermentação <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L.....	55
Figura 3. Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (MS) da dieta total em função do tempo de incubação, sob diferentes níveis de inclusão da <i>Spondias purpurea</i> L. ou monensina sódica.....	60
Figura 4. Degradabilidade da fibra em detergente neutro <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato da <i>Spondias purpurea</i> L. em 24 horas de incubação.....	61
Figura 5. Produção cumulativa de gases <i>in vitro</i> em função dos níveis de inclusão do extrato etanólico da <i>Spondias purpurea</i> L.....	65

RESUMO GERAL

LIMA, Eduardo Henrique Santos de. **Extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) na modulação da fermentação ruminal *in vitro***. Itapetinga, BA: UESB, 2026. 75 p. Tese (Doutorado em Zootecnia. Área de Concentração em Produção de Ruminantes). *

Objetivou-se avaliar o efeito do extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) (EESP) sobre a modulação da fermentação ruminal em sistema *in vitro*. Foram conduzidos ensaios experimentais utilizando delineamento inteiramente casualizado, com tratamentos constituídos por níveis de inclusão do extrato, em comparação a monensina. Foram avaliados parâmetros fermentativos, incluindo degradabilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro (FDN), tempo de colonização microbiana, pH ruminal, concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e perfil de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). O EESP apresentou em sua composição metabólitos secundários, como flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides e terpenos, compostos que podem atuar sobre a modulação ruminal. Sua inclusão promoveu aumento na produção cumulativa de gases e na degradabilidade da matéria seca e da FDN, além de redução no tempo de colonização microbiana, indicando intensificações da atividade fermentativa e maior eficiência na utilização dos substratos. A fração potencialmente degradável foi superior nos tratamentos com EESP em relação à monensina, enquanto a taxa de fermentação apresentou comportamento quadrático em função dos níveis de inclusão do EESP, sugerindo a existência de uma faixa ótima de inclusão. O pH ruminal foi influenciado pelos tratamentos, com redução linear à medida que se elevaram os níveis do EESP, porém mantendo-se dentro da faixa adequada para o funcionamento do ambiente ruminal. O aumento na produção de propionato, acompanhado da manutenção dos níveis de acetato e da relação acetato:propionato, além das diferenças observadas nas concentrações de butirato em relação à monensina. As variações nas concentrações de N-NH₃ evidenciam influência do EESP sobre o metabolismo nitrogenado e a atividade microbiana. Em contraste, a monensina promoveu redução na produção total de gases e na taxa de fermentação. A dose de 8% do EESP apresentou respostas semelhantes às observadas nos níveis superiores para os principais parâmetros fermentativos e de degradabilidade. Dessa forma, os resultados indicam que o EESP atua como modulador da fermentação ruminal, promovendo alterações na degradabilidade dos nutrientes, com potencial para melhorar a eficiência do processo fermentativo. Esses efeitos sugerem que o extrato pode representar uma alternativa promissora aos ionóforos na nutrição de ruminantes, especialmente em sistemas que demandam aditivos de origem natural. Entretanto, a ausência da quantificação de gases específicos, como o metano, bem como a caracterização detalhada dos compostos presentes no EESP, limita a compreensão dos mecanismos envolvidos. Assim, estudos adicionais, especialmente em condições *in vivo* são necessários para validar os efeitos observados e consolidar sua aplicação como aditivo alimentar.

Palavras-chave: aditivos naturais, compostos secundários, extrato vegetal, fermentação ruminal, monensina.

* Orientador: Márcio dos Santos Pedreira, Dr., UESB; Co-orientadora: Gabriele Marisco da Silva, Dra., UESB

GENERAL ABSTRACT

LIMA, Eduardo Henrique Santos de. **Ethanollic extract of seriguella leaves (*Spondias purpurea* L.) in the modulation of ruminal fermentation *in vitro***. Itapetinga, BA: UESB, 2026. 75 p. Thesis. (Doctor in Science. Concentration Area: Ruminant Production). *

This study evaluated the effects of ethanolic seriguella (*Spondias purpurea* L.) leaf extract (EESP) on *in vitro* ruminal fermentation. Experimental trials were conducted using a completely randomized design, with treatments consisting of different inclusion levels of the extract compared with monensin. Fermentation parameters were evaluated, including dry matter and neutral detergent fiber (NDF) degradability, microbial colonization time, ruminal pH, ammoniacal nitrogen (N-NH₃) concentration, and the short-chain fatty acid (SCFA) profile. The EESP contained secondary metabolites, including flavonoids, tannins, saponins, alkaloids, and terpenes, which may act as modulators of ruminal fermentation. Its inclusion increased cumulative gas production and the degradability of dry matter and NDF, while reducing microbial colonization time, indicating enhanced fermentative activity and greater efficiency of substrate utilization. The potentially degradable fraction was higher in treatments containing EESP than in those containing monensin, whereas the fermentation rate exhibited a quadratic response to EESP inclusion level, suggesting the existence of an optimal inclusion range. Ruminal pH was influenced by the treatments, showing a linear decrease as EESP levels increased; however, values remained within the range considered adequate for normal rumen function. Increased propionate production, together with the maintenance of acetate concentrations and the acetate: propionate ratio, as well as differences in butyrate concentrations compared with monensin, were also observed. Variations in N-NH₃ concentration demonstrated the influence of EESP on nitrogen metabolism and microbial activity. In contrast, monensin reduced total gas production and fermentation rate. The 8% EESP inclusion level produced responses similar to those observed at higher inclusion levels for the main fermentation and degradability parameters. These results indicate that EESP acts as a modulator of ruminal fermentation, promoting changes in nutrient degradability and potentially improving fermentation efficiency. Therefore, the extract may represent a promising alternative to ionophores in ruminant nutrition, particularly in production systems that require additives of natural origin. However, the lack of quantification of specific gases, such as methane, as well as the absence of a detailed characterization of the compounds present in EESP, limits the understanding of the mechanisms involved. Further studies, especially under *in vivo* conditions, are therefore needed to validate the observed effects and support its application as a feed additive.

Keywords: natural additives, secondary compounds, plant extract, ruminal fermentation, monensin.

* Advisor: Márcio dos Santos Pedreira, Dr., UESB; Co- advisor: Gabriele Marisco da Silva, Dra., UESB.

I - REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Introdução geral

O ecossistema ruminal constitui um sistema microbiano complexo e funcionalmente diversificado, composto por bactérias, arqueias metanogênicas, protozoários e fungos anaeróbios que atuam de forma integrada na fermentação dos componentes da dieta, influenciando diretamente a eficiência alimentar dos ruminantes (Fregulia et al., 2024).

No rúmen, a microbiota fermenta uma ampla gama de substratos dietéticos, incluindo carboidratos estruturais e não estruturais, bem como compostos nitrogenados, convertendo esses nutrientes principalmente em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que constituem os principais produtos da fermentação microbiana e representam a principal fonte de energia metabolizável para os ruminantes (Shi et al., 2025).

Apesar dessa elevada eficiência biológica, o processo fermentativo ruminal apresenta perdas energéticas inerentes que limitam o desempenho produtivo. Estima-se que entre 2-12% da energia bruta consumida seja perdida na forma de metano (CH₄), representando não apenas uma perda nutricional, mas também uma importante fonte de emissão de gases de efeito estufa (Ni et al., 2024). Ademais, a eficiência de conversão alimentar ainda pode ser comprometida por desequilíbrios na população microbiana, especialmente em sistemas intensivos baseados em dietas de alto concentrado, que aumentam a susceptibilidade à acidose ruminal (Retta, 2016).

Nesse contexto, a manipulação estratégica do ecossistema microbiano do rúmen emerge como uma abordagem promissora para aumentar a eficiência produtiva e, simultaneamente, mitigar os impactos ambientais da pecuária. A modulação da microbiota ruminal pode ser alcançada por diferentes estratégias, incluindo a administração de microrganismos benéficos, o uso de compostos que estimulam seletivamente populações microbianas desejáveis, a inclusão de aditivos capazes de redirecionar vias metabólicas específicas e intervenções nutricionais que alteram o ambiente ruminal (Gilbert et al., 2015; Belanche et al., 2021).

A monensina é um ionóforo produzido por *Streptomyces cinnamomensis*, amplamente utilizado como aditivo alimentar na nutrição de ruminantes com o objetivo de modular a fermentação ruminal e aumentar a eficiência alimentar (Rumsey, 1984). Apesar dos efeitos positivos associados à sua utilização, a monensina deixou de ser empregada como promotora de crescimento na União Europeia em decorrência de mudanças regulatórias voltadas à restrição do uso de antibióticos na produção pecuária. De acordo com o artigo nº 11 do Regulamento

(CE) nº 1831/2003, esses compostos passaram a ser classificados como antibióticos (Ojeu, 2003), em função do potencial risco de indução de resistência bacteriana em animais, com possíveis implicações para a saúde humana e impactos sobre a saúde pública (Tedeschi et al., 2003).

A intensificação da produção de ruminantes tem impulsionado a adoção de tecnologias nutricionais que elevem a eficiência alimentar, sendo os extratos vegetais e aditivos fitogênicos apontados como alternativas naturais aos antibióticos e ionóforos. Pesquisas destacam o potencial desses compostos em modular a microbiota ruminal, melhorar a utilização de nutrientes e reduzir emissões de metano, sem os efeitos colaterais associados aos aditivos sintéticos (Bature et al., 2024; Wang et al., 2024; Azzaz et al., 2025)

Os aditivos fitogênicos abrangem uma ampla gama de compostos derivados de plantas, incluindo extratos vegetais, óleos essenciais, taninos, saponinas e outros metabólitos secundários bioativos. Esses compostos podem modular o microbioma ruminal por meio de atividades antimicrobianas seletivas, da alteração de vias metabólicas específicas e da modificação da cinética fermentativa, resultando em mudanças no perfil de metabólitos produzidos no rúmen (Hassan et al., 2020). Estudos têm direcionado atenção especial aos extratos vegetais e fitoquímicos, os quais demonstram potencial para modular a fermentação ruminal e as populações microbianas de forma segura, sem contribuir para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana (El-Zaiat et al., 2024).

Entretanto, a eficácia desses compostos é fortemente dependente da dose, da composição química específica dos extratos, da dieta basal e da capacidade de adaptação da microbiota ruminal. Variações na concentração dos compostos fitogênicos podem influenciar diretamente sua atividade sobre a microbiota ruminal, podendo resultar tanto em redução da eficiência fermentativa quanto em respostas pouco expressivas, a depender das condições experimentais. Além disso, a adaptação microbiana ao longo do tempo pode reduzir a resposta aos compostos fitogênicos, reforçando a necessidade de avaliações criteriosas quanto à sua utilização (Hassan et al., 2020).

Diante desse contexto, a hipótese deste estudo é que o extrato etanólico das folhas da seriguela (*Spondias purpurea* L.) seja capaz de modular a fermentação ruminal, interferindo na dinâmica microbiana e no perfil de metabólitos produzidos em condições *in vitro*.

1.2. Fermentação Ruminal: fundamentos e desafios

A fermentação ruminal constitui um processo bioquímico anaeróbico que ocorre no rúmen, o maior compartimento do estômago dos ruminantes, e representa a principal via metabólica pela qual os carboidratos estruturais e não estruturais, as proteínas e os lipídios da dieta são convertidos em metabólitos passíveis de absorção e utilização pelo hospedeiro. Esse processo é fundamental para a eficiência de utilização de alimentos fibrosos pelos ruminantes e sustenta grande parte do aporte energético e proteico necessário à manutenção e à produção animal (Kozloski, 2009; Valadares Filho e Pina, 2006).

O rúmen abriga um ecossistema microbiano altamente especializado e funcionalmente integrado, composto predominantemente por bactérias, além de arqueias metanogênicas, protozoários e fungos. O conjunto de microrganismos atuam de forma sinérgica na degradação das paredes celulares vegetais, promovendo a liberação de energia na forma de AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato, além da produção de gases fermentativos, como dióxido de carbono (CO_2) e CH_4 . Adicionalmente, a biomassa microbiana sintetizada durante a fermentação ruminal constitui a principal fonte de proteína metabolizável para o animal, desempenhando papel central na nutrição proteica dos ruminantes (Ungerfeld, 2020; Eun et al., 2004; Lucci, 1997).

O funcionamento do processo fermentativo no rúmen está intrinsecamente associado à atividade metabólica da microbiota ruminal, a qual é regulada por um conjunto de fatores físico-químicos e nutricionais próprios do ambiente ruminal. A disponibilidade de substratos oriundos da dieta, aliada à remoção eficiente dos produtos da fermentação por absorção e eructação, ao tamponamento do meio promovido pela saliva, à dinâmica da taxa de passagem da fração indigestível, além da manutenção da osmolaridade, da anaerobiose e da temperatura fisiológica, são elementos essenciais para a estabilidade e eficiência da fermentação (Valadares Filho e Pina, 2006).

A intensidade e o padrão da fermentação ruminal são fortemente modulados por fatores dietéticos e fisiológicos, destacando-se a composição da dieta, especialmente a relação do volumoso:concentrado. Dietas com maior proporção de fibra, favorecem a atividade de microrganismos celulolíticos, resultando em maior produção de acetato, enquanto dietas com elevado teor de concentrados estimulam a produção de propionato e, em situações de fermentação excessivamente rápida, podem aumentar a formação de lactato. O pH ruminal desempenha papel determinante nesse processo, uma vez que valores reduzidos, comumente associados a dietas ricas em concentrado, promovem alterações na composição da microbiota,

inibem a atividade de microrganismos fibrolíticos e reduzem a expressão de enzimas envolvidas na degradação da fibra, comprometendo a eficiência digestiva (Li et al., 2018).

A influência da dieta sobre a fermentação ruminal não se limita ao perfil de AGCC, estendendo-se à produção de CH_4 . As vias fermentativas que favorecem a síntese de acetato e butirato promovem maior liberação de H_2 e CO_2 , substratos utilizados pelas arqueias metanogênicas para a formação de CH_4 , principal sumidouro de hidrogênio no rúmen e essencial para a manutenção do equilíbrio redox. Contudo, a metanogênese está associada a perdas energéticas e contribui de forma relevante para as emissões de gases de efeito estufa, sendo mais pronunciada em dietas ricas em volumosos (Kozloski, 2009; Nussio et al., 2006; Johnson e Johnson, 1995).

Em contrapartida, estudos científicos demonstram que o aumento da formação de propionato no rúmen atua como uma via competidora da metanogênese pela utilização de hidrogênio, reduzindo a disponibilidade de H_2 para arqueias metanogênicas e, conseqüentemente, a produção de CH_4 (Wang et al., 2023). Além disso, o propionato produzido na fermentação ruminal é o principal precursor gliconeogênico em ruminantes, contribuindo significativamente para o suprimento de glicose no fígado, com estimativas de participação entre 32% e 60% da glicose sanguínea total (Wiltrout e Satter, 1972)

A relação entre o perfil fermentativo ruminal e a produção de CH_4 tem sido amplamente investigada, evidenciando a importância do direcionamento metabólico do hidrogênio no rúmen. Bilby et al. (2022) relataram correlações entre as concentrações de AGCC e as emissões de CH_4 em bovinos leiteiros e de corte, demonstrando que a concentração de propionato apresentou correlação negativa com a produção de metano, enquanto maiores concentrações de acetato e uma relação acetato:propionato (A:P) mais elevada estiveram positivamente associadas às emissões entéricas de CH_4 . Os resultados reforçam o papel do propionato como um importante dreno alternativo de hidrogênio no ambiente ruminal.

Diante desse contexto, estratégias de manipulação da fermentação ruminal têm sido amplamente estudadas com o objetivo de otimizar a eficiência alimentar e reduzir as perdas energéticas. A utilização de aditivos alimentares, como ionóforos, compostos fenólicos de origem vegetal e outros moduladores da fermentação, tem demonstrado potencial para alterar a estrutura da microbiota ruminal, modificar o perfil de AGCC e reduzir a produção de CH_4 . Contudo, a magnitude e a persistência dos efeitos são dependentes da dose, da natureza do composto utilizado e da composição microbiana do rúmen, ressaltando a necessidade de abordagens nutricionais específicas e integradas para diferentes sistemas de produção (Vasta et al., 2019; Oliveira et al., 2019).

1.3. Uso de ionóforos (monensina) e limitações

A monensina, é um ionóforo poliéster carboxílico amplamente utilizado na nutrição de ruminantes, com objetivo de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos (Marques e Cooke, 2021). Esse efeito está associado à modulação do padrão fermentativo ruminal, com redução das concentrações de acetato e butirato e aumento da produção de propionato (Duffield et al., 2012). Seu mecanismo de ação inibe seletivamente as bactérias gram-positivas e protozoários, que são mais sensíveis por não possuírem uma membrana externa protetora, através de um mecanismo que desestabiliza o equilíbrio iônico vital dos microrganismos (Russel e Strobel, 1989).

A monensina altera o transporte de sódio (Na^+), potássio (K^+) e prótons, rompendo o gradiente eletroquímico celular. O influxo de Na^+ e H^+ e a saída de K^+ induzem a ativação intensa de bombas iônicas dependentes de ATP na tentativa de restabelecer a homeostase, resultando em elevado consumo energético, comprometimento do crescimento e, em casos extremos, morte bacteriana por exaustão energética. (Aowicki e Huczyński, 2013). Como consequência adicional, o acúmulo intracelular de cátions eleva a pressão osmótica, induzindo influxo de água, inchaço celular e eventual lise bacteriana (Russel e Strobel, 1989).

A menor suscetibilidade das bactérias gram-negativas aos ionóforos decorre de características estruturais da parede celular, que inclui uma membrana externa lipídica contendo porinas, canais proteicos responsáveis pela difusão seletiva de moléculas hidrofílicas com limite de permeabilidade em torno de 600 daltons. Considerando que a maioria dos ionóforos apresenta massa molecular superior a esse valor, sua passagem por essas porinas é limitada, reduzindo a eficácia do aditivo sobre as bactérias gram-negativas (Nagajara e Taylor, 1987).

Estudos *in vitro* demonstram que a monensina reduz a produção de amônia e a atividade específica de microrganismos ruminais responsáveis pela fermentação de aminoácidos e peptídeos, incluindo bactérias com elevada capacidade de produção de amônia (Yang; Russell, 1993; Chen; Russell, 1989; Chen et al., 1991). Resultados *in vivo* corroboram esses achados, evidenciando redução da concentração de amônia ruminal e da população de bactérias fermentadoras de aminoácidos em animais suplementados com o ionóforo (Yang; Russell, 1993).

No que se refere à fermentação de aminoácidos, estudos *in vitro* conduzidos em meio enriquecido com caseína hidrolisada demonstraram que a adição de monensina reduziu o acúmulo de amônia em comparação ao controle, especialmente nos primeiros dias de incubação, indicando a inibição de microrganismos hiperdesaminadores. Entretanto, quando o ionóforo foi removido após um período de adaptação, observou-se aumento subsequente na

produção de amônia, sugerindo que a comunidade microbiana ruminal responde à pressão seletiva por meio de alterações em sua estrutura populacional (Oliveira et al., 2006).

Dados de uma meta-análise conduzida em vacas leiteiras demonstraram que a suplementação com monensina, estão associadas à redução das emissões de CH₄ e da ingestão de matéria seca, sem efeitos adversos sobre o pH ruminal, a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) ou parâmetros sanguíneos. Observou-se diminuição da proporção molar de acetato e aumento da proporção de propionato, sem alteração na produção de butirato (Ahvanooei et al., 2023).

Pesquisas com metagenômicas indicam que a monensina promove alterações funcionais na microbiota ruminal, com aumento de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e lipídios e de metabólitos associados ao ácido linoleico, resultando em menor degradação de aminoácidos e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen e maior fluxo de proteína e ácidos graxos poli-insaturados ao intestino (Ogunade et al., 2018).

1.4. Alternativas naturais: metabólitos secundários

Os metabólitos secundários de plantas surgiram como uma alternativa natural promissora para modular a fermentação ruminal e reduzir as emissões de CH₄ (Ku-Vera et al., 2020; Patra et al., 2010; Jafari et al., 2019). Entre esses metabólitos incluem-se taninos, saponinas, óleos essenciais e ácidos fenólicos, originalmente sintetizados pelas plantas como mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos, mas que podem ser utilizados de forma estratégica para a manipulação da ecologia microbiana do rúmen (Cieslak et al., 2013).

A atuação dos compostos sobre a fermentação ruminal ocorre por meio de múltiplos mecanismos. Contudo, a magnitude de seus efeitos depende de diversos fatores, como a estrutura química, a concentração, a composição da dieta, a capacidade de adaptação das populações microbianas e as interações entre os diferentes metabólitos presentes (Qing et al., 2021; Ma et al., 2022).

1.4.1 Taninos

Os taninos são compostos polifenólicos classificados em taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) e taninos condensados (proantocianidinas) e são amplamente distribuídos em forragens, folhas de árvores e diversos tecidos vegetais (Jafari et al., 2019).

De acordo com Scalbert (1991), o mecanismo de ação dos taninos sobre microrganismos pode ocorrer por três maneiras principais, inibição de enzimas bacterianas e fúngicas,

complexação com os substratos dessas enzimas e interação com as membranas celulares, causando alterações metabólicas. Além disso, os taninos podem reduzir a disponibilidade de íons essenciais ao metabolismo microbiano por meio da formação de complexos com metais.

No rúmen, os mecanismos de ação dos taninos incluem ação inibitória sobre protozoários e bactérias metanogênicas, contribuindo para a redução da produção de N-NH_3 , CH_4 e da relação acetato:propionato (Cieslak et al., 2012). Esses compostos também interagem diretamente com a membrana da parede celular bacteriana, provocando alterações morfológicas e induzindo a secreção de enzimas extracelulares (Smith et al., 2005). Outra possibilidade é a ligação dos taninos às enzimas microbianas, resultando em alterações diretas no metabolismo celular (Bodas et al., 2012), podendo atuar como inibidores competitivos ou não competitivos, modificando a conformação do sítio ativo e bloqueando o acesso do substrato (Marion, 2016).

Em relação aos protozoários ruminais, os efeitos dos taninos ainda são descritos de forma inconsistente na literatura. Alguns estudos relatam resultados incertos ou pouco expressivos (Newbold et al., 2004; Benchaar et al., 2007), enquanto outros indicam elevada atividade antiprotozoária (Zhou et al., 2019). Embora o mecanismo exato de ação ainda não esteja completamente definido, acredita-se que a natureza lipofílica dos taninos permita a permeação dos compostos através da membrana protozoária, interferindo no metabolismo celular (Cardozo et al., 2006).

Os efeitos negativos dos taninos sobre a fermentação ruminal estão associados, principalmente, à redução das populações bacterianas totais e celulolíticas, o que pode resultar em diminuição da produção de AGCC (Castro-Montoya et al., 2011). Apesar disso, os taninos demonstram potencial para reduzir a produção de CH_4 , embora a eficácia varie de acordo com a fonte utilizada. Alguns estudos relataram reduções de até 50% na produção de CH_4 com o uso de taninos ou com sua suplementação (Patra e Saxena, 2010; Goel e Makkar, 2012).

O peso molecular dos taninos é um fator determinante, sendo que compostos de maior peso molecular apresentam impacto mais pronunciado na inibição da metanogênese. Esse efeito está relacionado às propriedades antimicrobianas dos taninos, que inibem microrganismos produtores de CH_4 por meio da ligação com proteínas dietéticas e enzimas microbianas (Bodas et al., 2012).

Outro mecanismo relevante envolve a inibição das bactérias celulolíticas, o que reduz a digestão da fibra e a fermentação do acetato, diminuindo a formação de H_2 disponível para a metanogênese (Bodas et al., 2012). Os taninos também se ligam aos carboidratos estruturais por meio de seus grupos hidroxila fenólicos, protegendo o substrato da degradação microbiana

(Patra e Saxena, 2011). Além disso, formam complexos com proteínas no rúmen, aumentando a quantidade de proteína disponível para a digestão no intestino delgado (Muller-Harvey, 2006).

1.4.2 Saponinas

As saponinas apresentam potencial para modular a fermentação ruminal e otimizar a utilização de nutrientes em ruminantes. Do ponto de vista químico, são glicosídeos formados por um ou mais monossacarídeos ligados, por ligação glicosídica, a uma aglicona, também denominada sapogenina (Patra e Saxena, 2009).

No rúmen, as saponinas podem formar complexos com os esteróis presentes nas membranas celulares dos protozoários, aumentando a permeabilidade, o que leva à ruptura e lise celular. O processo, denominado defaunação, refere-se à redução ou eliminação da população de protozoários no rúmen. No entanto, essa defaunação pode ser transitória, pois as saponinas são metabolizadas por microrganismos ruminais, que degradam sua estrutura em sapogeninas, uma forma inativa (Ramos-Morales et al., 2017).

A redução no número de protozoários no rúmen promove o aumento da síntese de proteína bacteriana e retarda a renovação da proteína ruminal, resultando em maior fluxo de nitrogênio bacteriano para o duodeno. Essa diminuição também impacta a produção de CH₄, uma vez que muitas arqueias metanogênicas vivem em associação simbiótica com os protozoários e utilizam o H₂ gerado durante o metabolismo protozoário para a metanogênese. Assim, com a defaunação, ocorre redução na disponibilidade de H₂, limitando a atividade das arqueias metanogênicas (Jayanegara et al., 2014).

Além do efeito indireto mediado pela defaunação, estudos indicam que as saponinas podem inibir diretamente as arqueias metanogênicas, ao afetar a expressão de genes essenciais para a metanogênese, como o gene *mcrA* (Guo et al., 2008). Os compostos também influenciam o metabolismo nitrogenado no rúmen, reduzindo as atividades proteolíticas e de desaminação associadas aos protozoários e a algumas bactérias ruminais. Com isso, ao inibir a atividade da urease microbiana, contribuem para a redução das concentrações de nitrogênio amoniacal, promovendo maior eficiência na utilização das proteínas alimentares pelos ruminantes (Spanghero et al., 2008; Patra e Saxena, 2009).

O efeito é atribuído, em grande parte, à redução da população de protozoários, considerando o papel crucial que esses microrganismos desempenham na degradação do nitrogênio dietético no rúmen (Newbold et al., 1997; Bodas et al., 2012). Para explicar a redução no metabolismo das proteínas ruminais, dois mecanismos principais têm sido propostos. O

primeiro consiste na diminuição da desaminação de proteínas e peptídeos (Busquet et al., 2005). O segundo envolve a inibição de microrganismos específicos, como as bactérias hiperamoniogênicas (HAP), bem como de suas atividades desaminases (Newbold et al., 2004).

Além disso, um mecanismo alternativo proposto por Headon et al. (1991) sugere que as saponinas podem se ligar ao $\text{NH}_3\text{-N}$, promovendo sua liberação controlada e assegurando um suprimento contínuo e adequado do composto para o crescimento microbiano ruminal. No que se refere à fermentação ruminal, as saponinas também influenciam a produção de AGCC, promovendo alterações em sua composição. A maioria dos estudos relata aumento na proporção de propionato, acompanhado pela redução nos níveis de acetato e butirato (Patra e Saxena, 2009; Castro-Montoya et al., 2011). Tais efeitos decorrem, principalmente, da ação inibitória das saponinas sobre bactérias gram-positivas responsáveis pela produção de acetato e sobre protozoários, favorecendo, assim, o aumento na síntese de propionato (Wallace, 2004).

1.4.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis extraídos de plantas aromáticas, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (Patra et al., 2012). Os compostos ativos mais importantes presentes nesses óleos podem ser classificados em dois grupos principais, terpenoides e fenilpropanoides. Os terpenoides compreendem monoterpenos, sesquiterpenos e, em menor proporção, diterpenos (Benchaar et al., 2007; Calsamiglia et al., 2007).

Os óleos essenciais atuam diretamente sobre as células metanogênicas devido às propriedades intrínsecas dos compostos ou dos metabólitos secundários das plantas que os compõem (Cieslak et al., 2013). Compostos como carvacrol, de natureza fenólica, e cinamaldeído, de natureza carbonílica, apresentam elevada atividade antimicrobiana em óleos ricos em monoterpenos. Dessa forma, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é fortemente influenciada pelas interações entre seus diferentes componentes (Cobellis et al., 2016).

O uso de misturas de óleos essenciais pode resultar em efeitos aditivos, antagônicos ou sinérgicos, dependendo das combinações entre os compostos presentes (Burt, 2004). Assim, a associação de diferentes óleos essenciais ou de seus metabólitos secundários pode contribuir para a melhoria da eficiência da fermentação ruminal (Benchaar e Greathead, 2011).

As propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes dos óleos essenciais favorecem seu uso como aditivos naturais em rações para animais. Seus compostos ativos são

capazes de desestabilizar as membranas de protozoários e de bactérias gram-positivas, de maneira semelhante à ação dos ionóforos (Castillejos et al., 2006).

A natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos cíclicos presentes nos terpenoides e fenilpropanoides permite que os compostos se acumulem na bicamada lipídica das bactérias, promovendo a desintegração das membranas e aumentando sua permeabilidade. Esse processo resulta na translocação de íons e na redução do gradiente iônico, levando ao consumo energético das bactérias e, em alguns casos, à morte celular, quando o metabolismo é desviado para a manutenção do equilíbrio iônico (Chao et al., 2000).

Seu mecanismo de ação é mais eficaz contra bactérias gram-positivas, cujas membranas celulares podem interagir diretamente com compostos hidrofóbicos dos óleos essenciais. Em contrapartida, as bactérias gram-negativas possuem uma camada externa de lipopolissacarídeos que atua como barreira hidrofílica, dificultando a penetração de substâncias hidrofóbicas, como os óleos essenciais (Chao et al., 2000).

Apesar dessa maior resistência, a membrana externa das bactérias gram-negativas não é completamente impermeável a compostos de baixa massa molecular. Os compostos podem interagir com a água por meio de pontes de hidrogênio, atravessar lentamente a parede celular por difusão através da camada de lipossacarídeos ou por proteínas de membrana e, posteriormente, interagir com a bicamada lipídica das células. Dessa forma, mesmo as bactérias gram-negativas podem ser afetadas pelos óleos essenciais (Calsamiglia et al., 2007).

Foi sugerido que um dos principais mecanismos de ação dos óleos essenciais consiste na inibição da ligação bacteriana às partículas alimentares, resultando na redução da produção de N-NH_3 proveniente da desaminação de aminoácidos (Wallace et al., 2002). A ação desses compostos pode variar de acordo com sua composição química, uma vez que extratos de óleo obtidos de diferentes espécies de uma mesma planta podem apresentar efeitos estimulantes ou inibitórios sobre a fermentação ruminal (Patra e Saxena, 2009).

Calsamiglia et al. (2007) explicam que a eficácia dos óleos essenciais é favorecida em condições de baixo pH, quando os compostos se encontram na forma não dissociada e mais hidrofóbica, o que facilita sua interação com os lipídios das membranas celulares bacterianas. As alterações na fermentação ruminal também estão associadas à redução da concentração de N-NH_3 , decorrente do efeito dos óleos essenciais sobre bactérias produtoras de hiperamônia. Esse processo resulta na diminuição da desaminação de aminoácidos, na redução da emissão de metano e na menor contagem de protozoários (Sallam et al., 2011, 2012).

As modificações nos parâmetros fermentativos, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), tornam-se mais evidentes em condições de pH ruminal reduzido,

reforçando a maior eficácia das moléculas hidrofóbicas e não dissociadas dos óleos essenciais na interação com as membranas celulares dos microrganismos ruminais (Spanghero et al., 2008).

1.4.4 Flavonoides

Os compostos fenólicos abrangem uma ampla diversidade estrutural, incluindo ácidos fenólicos simples, flavonoides e polifenóis complexos (Qing et al., 2021; Yu et al., 2024). Esses compostos têm sido amplamente estudados devido à sua capacidade de modular a fermentação ruminal por diferentes mecanismos, destacando-se a atividade antioxidante, a inibição enzimática e os efeitos antimicrobianos diretos (Liu et al., 2024).

Os flavonoides se destacam como potentes antioxidantes naturais, são estruturalmente formados por dois anéis de benzeno conectados por três átomos de carbono que compõem um heterociclo oxigenado. Amplamente distribuídos em diversas espécies vegetais, desempenham papel relevante na modulação de processos biológicos no rúmen. Seus efeitos antibacterianos são comparáveis aos dos ionóforos, uma vez que exercem ação seletiva contra bactérias gram-positivas, favorecendo a produção de propionato em detrimento do acetato e, conseqüentemente, aumentando a eficiência energética dos animais (Cushnie e Lamb, 2005).

Os mecanismos de ação dos flavonoides incluem danos à membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos, comprometimento do metabolismo energético e interferências na parede celular bacteriana (Cushnie e Lamb, 2011; Xie et al., 2015), interagem com centros nucleofílicos presentes no peptidoglicano, tornando as bactérias gram-positivas mais suscetíveis, devido à maior proporção do componente em suas paredes celulares (Babii et al., 2018). Como consequência, ocorre redução dessas populações bacterianas, ao mesmo tempo em que há favorecimento de bactérias gram-negativas produtoras de propionato, promovendo alterações benéficas no perfil fermentativo ruminal (Oskoueian et al., 2013; Seradj et al., 2014).

Outro benefício associado ao uso de flavonoides é a redução das emissões de CH₄ no rúmen, atribuída tanto à inibição direta das populações metanogênicas quanto à diminuição do número de protozoários. A defaunação ruminal tem sido apontada como uma estratégia eficaz para mitigar a produção de CH₄ (Hook et al., 2010). Nesse contexto, estudos demonstram que flavonoides são capazes de inibir o crescimento de protozoários em ruminantes, possivelmente por meio de interferências na parede celular ou na síntese de ácidos nucleicos (Cherdthong et al., 2019).

Os flavonoides também estão associados à diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) no rúmen, indicando menor degradação proteica. Protozoários e bactérias específicas, especialmente as proteolíticas e hiperprodutoras de amônia, são os principais responsáveis pela formação de $\text{NH}_3\text{-N}$ (Bach et al., 2005). Dessa forma, a ação dos flavonoides contribui para melhorar a eficiência do uso do nitrogênio, ao aumentar a rotatividade microbiana no intestino e elevar o suprimento de proteína microbiana no fluxo duodenal (Balcells et al., 2012).

Apesar do reconhecido potencial dos flavonoides, seus efeitos podem variar de acordo com a estrutura química dos compostos e com as condições do ambiente ruminal. (Olagaray e Bradford, 2019; Morsy et al., 2021). Ainda assim, há consenso de que os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, promovem benefícios à microbiota ruminal e ao desempenho animal por mecanismos semelhantes aos observados para a monensina sódica (Yaghoubi et al., 2008).

1.4.5 Alcaloides

Os alcaloides constituem um vasto grupo de metabólitos secundários, com várias estruturas moleculares já identificadas, essas moléculas orgânicas são sintetizadas principalmente a partir de aminoácidos, como ornitina, lisina e triptofano, e apresentam como característica marcante a presença de um átomo de nitrogênio em anel heterocíclico (Desmet et al., 2021).

A ampla variabilidade estrutural dos alcaloides permite sua classificação em diferentes grupos, como indólicos, piridínicos e esteroidais. A diversidade química está diretamente relacionada à grande variedade de atividades biológicas atribuídas aos compostos, que incluem desde efeitos farmacológicos, como ação anestésica e analgésica, até propriedades antimicrobianas. Plantas ricas em alcaloides têm sido associadas a casos de envenenamento em animais e humanos, em função da toxicidade apresentada por algumas espécies. Apesar do potencial tóxico de algumas espécies vegetais, determinados alcaloides têm demonstrado aplicações terapêuticas e potencial de utilização como aditivos na nutrição animal (Wink, 1998).

O mecanismo de ação dos alcaloides está relacionado às suas propriedades anfotéricas, que combinam características polares e apolares. Essa particularidade permite que interajam com as membranas celulares dos microrganismos, interferindo no transporte de íons e de outras substâncias essenciais. Dependendo da concentração e da susceptibilidade microbiana, os

alcaloides podem promover desorganização estrutural das células, resultando em morte celular. O efeito é mais pronunciado em bactérias gram-positivas, enquanto as gram-negativas apresentam maior resistência devido às diferenças na composição de suas membranas celulares (García e Carril, 2009).

No ambiente ruminal, os alcaloides têm demonstrado eficácia contra microrganismos específicos. Estudos indicam que os compostos reduzam as populações de protozoários e de arqueias metanogênicas, impactando diretamente o processo fermentativo. A diminuição da disponibilidade de hidrogênio para a metanogênese promove o redirecionamento do fluxo metabólico em favor da produção de propionato. Como consequência, observa-se também a redução das emissões de metano, representando um benefício ambiental relevante (Lambo et al., 2024).

A ação dos alcaloides é frequentemente comparada à dos ionóforos, amplamente utilizados na nutrição animal. Os alcaloides promovem o transporte de cátions através das membranas celulares, alterando o equilíbrio iônico intracelular. A alteração do equilíbrio iônico resulta em aumento da pressão osmótica, maior demanda energética e redução da capacidade de divisão celular. Com a exposição prolongada, as células afetadas apresentam rompimento da membrana e morte celular. A ação seletiva sobre bactérias gram-positivas tem sido explorada como estratégia para melhorar a eficiência alimentar de ruminantes (Singh et al., 2011; Berchielli et al., 2011).

1.5 Ionóforos e metabólitos secundários na modulação da fermentação ruminal

Os ionóforos são amplamente utilizados na nutrição de ruminantes devido à sua capacidade de modular a fermentação ruminal, promovendo melhorias na eficiência alimentar e no aproveitamento energético da dieta. Entre os principais compostos utilizados destaca-se a monensina sódica, cuja ação está relacionada à alteração do transporte de íons através da membrana celular de bactérias gram-positivas, promovendo modificações na microbiota ruminal e favorecendo maior produção de propionato em detrimento da formação de acetato e metano (Russell e Strobel, 1989; Nagajara e Taylor, 1987).

Apesar da ampla utilização dos ionóforos, especialmente da monensina sódica, o interesse por alternativas naturais tem aumentado nos últimos anos, impulsionado tanto pelas exigências regulatórias quanto pela crescente demanda por sistemas de produção mais sustentáveis (USDA, 2022). Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado que extratos vegetais podem atuar sobre a dinâmica fermentativa ruminal, influenciando vias biológicas

associadas à metanogênese (Elghandour et al., 2023). Entre os compostos mais investigados destacam-se taninos, saponinas, óleos essenciais e compostos fenólicos, os quais apresentam potencial para alterar a microbiota ruminal e modificar o perfil fermentativo (Jq et al., 2022).

Entre as espécies vegetais com potencial para aplicação na nutrição animal, destaca-se a seriguela (*Spondias purpurea* L.), espécie frutífera pertencente à família *Anacardiaceae*, originária da América Central e adaptada às condições tropicais e semiáridas. No Brasil, seu cultivo concentra-se principalmente na região Nordeste, onde apresenta relevância econômica e ampla adaptação às condições edafoclimáticas locais (Souza & Mendes, 2026).

Além disso, espécies do gênero *Spondias* têm despertado interesse científico devido à presença de compostos bioativos. Estudos com folhas de *Spondias mombin*, espécie do mesmo gênero da seriguela, demonstraram a ocorrência de flavonoides, taninos, saponinas e fenóis, associados a atividades antioxidantes e antimicrobianas, indicando potencial para aplicações na nutrição animal (Njoku e Akumefula, 2007; Ogunro et al., 2023). Dessa forma, a ampla disponibilidade da seriguela no Nordeste brasileiro, associada à presença de metabólitos secundários bioativos, justifica a investigação do extrato etanólico de suas folhas como alternativa natural para modulação da fermentação ruminal.

Assim, a hipótese é que o extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) seja capaz de modular a fermentação ruminal in vitro, promovendo alterações na cinética e no perfil fermentativo, bem como na degradabilidade dos nutrientes, com respostas semelhantes às observadas para a monensina sódica.

1.6 Referências bibliográficas

- Ahvanooei, M. R. R., Norouzian, M. A., Piray, A. H., Vahmani, P., & Jafari, M. H. (2024). Effects of monensin supplementation on rumen fermentation, methane emissions, nitrogen balance, and metabolic responses of dairy cows: A systematic review and dose-response meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, 107, 607–624. doi:10.3168/jds.2023-23441
- Aowicki, D., & Huczyński, A. (2013). Structure and antimicrobial properties of monensin A and its derivatives: Summary of the achievements. **BioMed Research International**, 2013, 742149.
- Azzaz, H. H., Hassaan, N. A., Gouda, G. A., Chen, Y., & Kholif, A. E. (2025). A phytogenic feed additive blend as a replacement for monensin in lactating Rahmani ewes' diets: Effects on feed utilization and milk production. **Animal Feed Science and Technology**, 116397. doi:10.1016/j.anifeedsci.2025.116397
- Babii, C., Mihalache, G., Bahrin, L. G., Neagu, A., Birsă, L. M., Gostin, I., Mihai, C. T., Sa, L., & Stefan, M. (2018). A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: In vitro activity and proposed mode of action. **PLoS ONE**, 13, 1–15.
- Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, M. D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, 88, E9–E21.
- Balcells, J., Aris, A., Serrano, A., Seradj, A., Crespo, J., & Devant, M. (2012). Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science**, 90, 4975–4984.
- Bature, I., Wang, X., & Ding, X. (2024). The roles of phytogenic feed additives, trees, shrubs, and forages on mitigating ruminant methane emission. **Frontiers in Veterinary Science**, 11, 1475322. doi:10.3389/fvets.2024.1475322
- Belanche, A., Newbold, C. J., Lin, W., Stevens, P. R., & Kingston-Smith, A. H. (2021). Editorial: Gut microbiome modulation in ruminants: Enhancing advantages and minimizing drawbacks. **Frontiers in Microbiology**, 11, 622002. doi:10.3389/fmicb.2020.622002
- Benchaar, C., & Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, 166, 338–355.
- Benchaar, C., Chaves, A. V., Fraser, G. R., et al. (2007). Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. **Canadian Journal of Animal Science**, 87, 413–419.
- Berchielli, T. T., Pires, A. V., & Oliveira, S. G. (2011). **Nutrição de ruminantes** (2ª ed.). Jaboticabal: Funep.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., et al. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, 176, 78–93.

- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, 223–253.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., et al. (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, 88, 4393–4404.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., et al. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Animal Science**, 90, 2580–2595.
- Cardozo, P. W., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2006). Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. **Journal of Animal Science**, 84, 2801–2808. <https://doi.org/10.2527/jas.2005-593>
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., & Ferret, A. (2006). Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. **Journal of Dairy Science**, 89, 2649–2658. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72341-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-4)
- Castro-Montoya, J. M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2011). Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. **Canadian Journal of Animal Science**, 91, 433–448. <https://doi.org/10.4141/CJAS2010-028>
- Chao, S. C., Young, D. G., & Oberg, C. J. (2000). Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi, and viruses. **Journal of Essential Oil Research**, 12, 639–649.
- Chen, G., & Russell, J. B. (1989). More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, 55(5), 1052–1057.
- Chen, G. J., Russell, J. B., et al. (1991). Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation, and deamination by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, 69(5), 2196–2203.
- Cherdthong, A., Khonkhaeng, B., Foiklang, S., Wanapat, M., Gunun, N., Gunun, P., et al. (2019). Effects of supplementation of Piper sarmentosum leaf powder on feed efficiency, rumen ecology, and rumen protozoal concentration in Thai native beef cattle. **Animals**.
- Cieslak, A., Szumacher-Strabel, M., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animals**, 7, 253–265.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., et al. (2012). Effects of tannins source (*Vaccinium vitis-idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. **Animal Feed Science and Technology**, 176, 102–106.
- Cobellis, G., Marinucci, M. T., & Yu, Z. (2016). Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. **Science of the Total Environment**, 545–546, 556–568.
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26, 343–356.

- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 38, 99–107.
- Desmet, S., Morreel, K., & Dauwe, R. (2021). Origin and function of structural diversity in the plant specialized metabolome. **Plants**, 10, 2393. <https://doi.org/10.3390/plants10112393>
- Duffield, T. F., Merrill, J. K., & Bagg, R. N. (2012). Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, 90, 4583–4592.
- Elghandour, M. M., Acosta-Lozano, N., Alvarado, T. D., Inyang, U. A., Purba, R. A. P., Castillo-Lopez, E., Barros-Rodriguez, M., & Salem, A. Z. (2023). Influence of *Azadirachta indica* and *Cnidioscolus angustidens* aqueous extract on cattle ruminal gas production and degradability *in vitro*. **Frontiers in Veterinary Science**, 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1090729>
- El-Zaiat, H. M., Morsy, A. S., Sallam, S. M. A., Abdalla, A. L., & Vitti, D. M. S. S. (2024). Effects of chitosan-based additive on rumen fermentation and microbial community, nutrients digestibility and lactation performance in goats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 108(4), 1057–1070. doi:10.1111/jpn.14057
- F, J. Q., H, M. C., R, B. M., T, J. M., & Kebreab, E. (2022). Enteric methane mitigation interventions. **Translational Animal Science**, 6, 1–16. <https://doi.org/10.1093/tas/txac041>
- Fregulia, P., Park, T., Li, W., et al. (2024). Microbial inoculum effects on the rumen epithelial transcriptome and rumen epimural metatranscriptome in calves. **Scientific Reports**, 14, 16914. doi:10.1038/s41598-024-65685-y
- García, A. Á., & Carril, E. P.-U. (2009). Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, 2(3), 119–145.
- Gilbert, R. A., Klieve, A. V., & Ouwerkerk, D. (2015). Modulation of the rumen microbiome. **Microbiology Australia**, 36(1), 6–9. doi:10.1071/MA15006
- Goel, G., & Makkar, H. P. S. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical Animal Health and Production**, 44, 729–739.
- Guo, Y. Q., Liu, J. X., Lu, Y., et al. (2008). Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene in cultures of rumen microorganisms. **Letters in Applied Microbiology**, 47, 421–426.
- Hassan, F. U., Arshad, M. A., Ebeid, H. M., Rehman, M. S., Khan, M. S., Shahid, S., & Yang, C. (2020). Phytogenic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction. **Frontiers in Veterinary Science**, 7, 575801. doi:10.3389/fvets.2020.575801
- Headon, D. R., Buggle, K., Nelson, A., & Killeen, G. (1991). Glycofractions of the *Yucca* plant and their role in ammonia control. In T. P. Lyons (Ed.), **Biotechnology in the Feed Industry** (pp. 95–108). Nicholasville: Alltech Technical Publications.

Hook, S. E., Wright, A. D., & McBride, B. W. (2010). Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, 2010, 945785.

Huczyński, A., Stefańska, J., Przybylski, P., Brzezinski, B., & Bartl, F. (2008). Synthesis and antimicrobial properties of monensin A esters. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 18, 2585–2589.

Jayanegara, A., Wina, E., & Takahashi, J. (2014). Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: Influence of addition levels and plant sources. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 27, 1426–1435.

Ku-Vera, J. C., et al. (2020). Role of secondary plant metabolites on enteric methane mitigation in ruminants. **Frontiers in Veterinary Science**. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00584>

Lambo, M. T., Ma, H., Liu, R., Dai, B., Zhang, Y., & Li, Y. (2024). Review: Mechanism, effectiveness, and the prospects of medicinal plants and their bioactive compounds in lowering ruminants' enteric methane emission. **Animal**, 18, 101134. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2024.101134>

Marques, R. S., & Cooke, R. F. (2021). Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. **Animals**, 11, 2871. doi:10.3390/ani11102871

Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86, 2010–2037.

Nagajara, T. G., & Taylor, M. B. (1987). Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, 53, 1620–1625.

Ni, Y., Deusch, S., Seifert, J., Stingl, U., Zhu, Q., Li, F., & Boeren, S. (2024). Methanogenesis inhibition remodels microbial fermentation and stimulates acetogenesis in ruminants. **bioRxiv**, 2024.08.15.608071. doi:10.1101/2024.08.15.608071

Official Journal of the European Union. (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, L268, 29–43.

Ogunade, I., Schweickart, H., Andries, K., Lay, J., & Adeyemi, J. (2018). Monensin alters the functional and metabolomic profile of rumen microbiota in beef cattle. **Animals**, 8, 211. doi:10.3390/ani8110211

Ogunro, O. B., Oyeyinka, B. O., Gyebi, G. A., & Batiha, G. E.-S. (2023). Nutritional benefits, ethnomedicinal uses, phytochemistry, pharmacological properties and toxicity of Spondias mombin Linn: A comprehensive review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 75(2), 162–226. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac086>

Official journal of the european union - OJEU. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and the Council of 22 of September of 2003 on Additives for Use in Animal Nutrition. Pages L268/29-L268/43 in OJEU of 10/18/2003.

- Oliveira, J. S., Queiroz, A. C., Lana, R. P., Mantovani, H. C., & Generoso, R. A. R. (2006). Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 35(1), 275–281.
- Retta, K. S. (2016). Role of probiotics in rumen fermentation and animal performance: A review. **International Journal of Livestock Production**, 7(5), 24–37. doi:10.5897/IJLP2016.0285
- Rumsey, T. S. (1984). Monensin in cattle: Introduction. **Journal of Animal Science**, 58(6), 1461–1464.
- Russell, J. B., & Strobel, H. J. (1989). Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, 55, 1–6.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, 30(12), 3875–3883. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
- Shi, J., Su, H., He, S., Dai, S., Mao, H., & Wu, D. (2025). Pan-genomic insights into rumen microbiome-mediated short-chain fatty acid production and regulation in ruminants. **Microorganisms**, 13(6), 1175. doi:10.3390/microorganisms13061175
- Souza, F. X. de, & Mendes, N. V. B. (2026). Aspectos gerais das principais Spondias cultivadas no Nordeste do Brasil. Fortaleza: **Embrapa Agroindústria Tropical** (Documentos, 205).
- Tedeschi, L. O.; Fox, D. G.; Tylutki, T. P. (2003). Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. **Journal Environmental Quality**, v.32, p.1591.
- United States Department of Agriculture (USDA). (2022). **National organic program regulations**. Agricultural Marketing Service.
- Wallace, R. J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. **Proceedings of the Nutrition Society**, 63, 621–629.
- Wang, J., Deng, L., Chen, M., Che, Y., Li, L., Zhu, L., Chen, G., & Feng, T. (2024). Phytogenic feed additives as natural antibiotic alternatives in animal health and production: A review of the literature of the last decade. **Animal Nutrition**, 17, 244–264. doi:10.1016/j.aninu.2024.01.012
- Yang, C. M. J., & Russell, J. B. (1993). Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, 59(10), 3250–3254.
- Zhou, R., Wu, J., Zhang, L., et al. (2019). Effects of oregano essential oil on the ruminal pH and microbial population of sheep. **PLoS ONE**, 14, e0217054

II - OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do extrato etanólico das folhas da seriguela (*Spondias purpurea* L.) sobre a fermentação ruminal *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a cinética fermentativa associada às diferentes doses do extrato etanólico das folhas da seriguela em comparação à monensina sódica;
- Determinar os efeitos das diferentes doses do extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) e da monensina sódica sobre a degradabilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro, bem como sobre os parâmetros fermentativos ruminais *in vitro*, incluindo pH, concentração de nitrogênio amoniacal e perfil de ácidos graxos voláteis;
- Identificar as concentrações do extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) com maior potencial modulador da fermentação ruminal *in vitro*.

III - CAPÍTULO I

Artigo publicado na Ciência Animal Brasileira | Brazilian Animal Science (CAB)

(e-ISSN 1809-689)

DOI: 10.1590/1809-6891v27e-83824E

***In vitro* screening of ethanolic leaf extract of *Spondias purpurea* L. on ruminal fermentation**

Eduardo Henrique Santos de Lima¹ 0000-0002-9147-3940

Márcio dos Santos Pedreira¹ 0000-0002-1151-1127

Gabriele Marisco da Silva² 0000-0002-8301-8673

Grazielle Goes Rios¹ 0009-0005-5756-9462

Vanessa Santos Souza Evangelista¹ 0000-0002-3905-9988

Juan Mark Silva Amorim¹ 0000-0002-3598-2054

Luiza Maria Gigante Nascimento¹ 0000-0001-6115-0684

1 State University of Southwest Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brazil

2 State University of Southwest Bahia (UESB), Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

*Corresponding author: ehslmvz@gmail.com

Abstract

Nutritional strategies that optimize forage use have received increasing attention, particularly practices that enhance ruminal degradability and microbial activity. Natural additives rich in phytochemicals can modulate ruminal microbiota and fermentative processes, representing promising alternatives in ruminant nutrition. This study aimed to evaluate effects of ethanolic extract from *Spondias purpurea* L. leaves on *in vitro* ruminal fermentation. A completely randomized design was adopted with three treatments: control, monensin, and plant extract. Gas production kinetics, dry matter degradability, and pH were evaluated at different incubation times. Phytochemical screening identified alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and terpenes in the extract, indicating potential to modulate ruminal microbiota. Results showed that the extract increased cumulative gas production and dry matter degradability. In addition, a reduction in microbial colonization time was observed, while pH remained within the optimal range for ruminal fermentation. Although fermentation rate was lower than in the control treatment, cumulative gas production was higher in the extract treatment, indicating enhanced fermentative activity. In contrast, monensin reduced both fermentation rate and gas volume. These findings demonstrate that *S. purpurea* L. leaf extract modulates ruminal fermentation *in vitro* and represents a promising natural additive. Further studies should evaluate different inclusion levels and their effects on short-chain fatty acid production, methane emission, ammoniacal nitrogen, and fiber and non-fibrous carbohydrate degradability, as well as conduct *in vivo* trials.

Keywords: natural additives; microbial metabolism; ruminal modulation; ruminants.

Introduction

Ruminants play a strategic role in global food security and sustainability of agricultural systems due to their ability to convert plant biomass into animal protein of high biological value ⁽¹⁾. In addition, these animals efficiently utilize resources often considered waste or agro-industrial by-products, promoting their valorization as products such as meat and milk ⁽²⁾. Although forages form the basis of ruminant diets, many forage resources present important limitations, mainly because of pronounced seasonal variation in nutritional composition and biomass production. These factors compromise animal performance and feeding efficiency. During periods of reduced forage quality, lower concentrations of soluble carbohydrates, limited availability of nitrogenous compounds, and increased lignin content are commonly observed, conditions that restrict substrate degradation and impair ruminal fermentation ⁽³⁾.

Consequently, diets characterized by low nutritional quality increase methane production in the rumen, resulting in substantial losses of metabolizable energy and nutrients that could otherwise support animal productivity ⁽⁴⁾. Enhanced methanogenesis is primarily associated with greater hydrogen release during degradation of fibrous fraction, which serves as a substrate for methanogenic archaea. Moreover, this fermentative pattern favors acetate production at the expense of propionate, reducing hydrogen sequestration and further intensifying methane emissions ⁽⁵⁾.

The use of feed additives, particularly ionophore antibiotics, has proven effective in improving energy efficiency, reducing excessive protein degradation, and stabilizing ruminal pH ⁽⁶⁾. However, prolonged, and indiscriminate use of these compounds has contributed to development of antimicrobial resistance, raising public health concerns ⁽⁷⁾ and leading to their prohibition as feed additives in the European Union ⁽⁸⁾. In this context, nutritional strategies that enhance efficient use of widely available forage resources with inherent nutritional limitations have become increasingly important. Among these strategies, proper grazing management stands out for maximizing forage quality and reducing losses associated with senescence ⁽⁹⁾. Additional approaches include practices that improve ruminal digestibility, such as harvesting forages at earlier vegetative stages, adjusting supply of physically effective fiber ⁽¹⁰⁾, and providing protein–energy supplementation, which stimulates intake, microbial activity, and fiber degradation ⁽¹¹⁾. Furthermore, inclusion of alternative ingredients, particularly natural additives, represents a strategy aimed at modulating ruminal microbiota and fermentative pathways ⁽¹²⁾. Plants rich in phytochemicals and their extracts have emerged as promising alternatives to conventional additives, offering a more sustainable approach consistent with current ruminant nutrition strategies ⁽¹³⁾.

Spondias purpurea L., popularly known as seriguela, is a species native to Central America and widely distributed throughout northeastern Brazil. Traditionally used in folk medicine, this plant exhibits antimicrobial, antioxidant, antidiarrheal, and gastroprotective properties ⁽¹⁴⁾. Studies involving other species of the genus *Spondias* indicate that animal responses vary according to plant part used and inclusion level. Qualitative phytochemical screening of *Spondias mombin* leaves revealed presence of bioactive compounds such as tannins, flavonoids, saponins, alkaloids, and phenolic compounds ⁽¹⁵⁾.

Residues from *Spondias tuberosa* pulp have been associated with increased fiber intake and rumination time, although reductions in dry matter digestibility were reported ⁽¹⁶⁾. Inclusion levels equal to or greater than 50% of *Spondias mombin* associated with cassava flour increased intake and weight gain in sheep without impairing digestibility ⁽¹⁷⁾. Despite these findings, studies evaluating *Spondias purpurea* L. and its application in ruminant nutrition remain limited.

Therefore, this study aimed to investigate effects of ethanolic extract from *Spondias purpurea* L. leaves on gas production kinetics, dry matter degradability, and ruminal pH under *in vitro* ruminal fermentation conditions.

Materials and methods

The experiment was conducted at the Animal Nutrition Laboratory of the State University of Southwest Bahia (UESB), Vitória da Conquista campus, Bahia, Brazil. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the State University of Southwest Bahia (CEUA-UESB) under protocol no. 245/2024.

Leaves of *seriguela* (*Spondias purpurea* L.) were collected, taxonomically identified, and deposited in the herbarium of UESB. Immediately after harvesting, the plant material was transported to the laboratory, dried in a forced-air oven at approximately 40 °C, and subsequently macerated using a pestle to obtain the dried plant material used for extraction.

For extract preparation, a 100-g sample of dried leaves was exhaustively extracted with ethanol (99.9%) in successive 72-h cycles. After each extraction cycle, the material was filtered through filter paper, and the solvent was removed under reduced pressure using a rotary evaporator. The concentrated extract was then subjected to qualitative phytochemical screening to detect alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and terpenoids, following established methodologies ^(18,19).

[illegible]

	Tifton hay	Ground corn	Soybean meal
Experimental diet	308.0	492.0	200.0

¹Dry matter, ²Mineral matter, ³Crude protein, ⁴Ether extract, ⁵Neutral Detergent Fiber, ⁶Acid Detergent Fiber, ⁷Hemicellulose, ⁸Total carbohydrates, ⁹Non-fibrous carbohydrates.

Ruminal fluid used as the inoculum for gas production assays was obtained from two rumen-cannulated Holstein crossbred cows (650 ± 50 kg live weight). Animals had free access to water and were fed, for 15 days before the experiment, a diet based on elephant grass supplemented daily with a concentrate composed of ground corn, soybean meal, and a mineral supplement.

Ruminal fluid was collected from different rumen compartments, filtered through gauze, and stored in prewarmed thermos bottles at 39 °C before transport to the laboratory. Fluid collected from both donor animals was pooled in equal proportions and continuously flushed with CO₂ to maintain anaerobic conditions.

The incubation medium was prepared according to Theodorou et al. ⁽²⁴⁾. The medium consisted of 500 mL of distilled water, 200 mL of buffer solution, 200 mL of macromineral solution, 60 mL of reducing agent, and 0.1 mL of micromineral solution, with resazurin included as a redox indicator in the reducing solution. The mixture was gently stirred and saturated with CO₂ until a pH of 6.8–6.9 was achieved, indicated by a pink coloration.

Ingredients of the experimental diet were ground to a particle size of 1 mm and weighed separately into nylon bags (5×10 cm) with a pore size of 50 µm, at a rate of 1 g of substrate per bag. Bags were placed in 160-mL glass flasks. A completely randomized design (CRD) was adopted with three treatments: ethanolic extract of *Spondias purpurea* L., sodium monensin included at 5 µM ⁽²⁵⁾, and a control without additives. Because the extract exhibited high viscosity, it was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). Each flask received 87 mL of incubation medium, 3 mL of pure DMSO for the control and monensin treatments, or 3 mL of *Spondias purpurea* L. ethanolic extract diluted to 8% in DMSO, resulting in a final volume of 90 mL per flask.

In the laboratory, flasks were inoculated using a buffer medium to ruminal fluid ratio of 9:1 (v: v), corresponding to 10 mL of ruminal fluid per flask. Flasks were flushed with CO₂, sealed with expandable rubber stoppers, and contained the substrate before inoculation. After inoculum injection, the needle was maintained in the stopper for a few seconds to release excess gas and ensure zero internal pressure. Flasks were then gently shaken and incubated in a forced-

air oven at 39 °C, marking time zero. Treatments were conducted in triplicate. Additionally, three flasks containing only ruminal fluid and incubation medium were included as blanks.

Gas production kinetics were evaluated using the semi-automated gas production technique described by Maurício et al. ⁽²⁶⁾ and modified by Menezes et al. ⁽²⁷⁾. Headspace pressure was measured using a pressure transducer (Type T443A, Bailey and Mackey, England) connected to a digital pressure indicator. Measurements were taken by inserting a 21G × 1" (0.80 × 25 mm) needle through the flask stopper. Pressure readings, expressed in pounds per square inch (psi), were recorded during the fermentation period at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 48, and 72 h of incubation.

Pressure data were converted to gas volume using the equation proposed by Figueiredo et al. ⁽²⁸⁾, adjusted for local altitude:

$$V = -0.02 + 4.30p + 0.07 p^2, R^2 = 0.99$$

Wherein: "V" is the volume (mL) and "p" is the gas pressure in fermentation flasks (psi).

Kinetics of cumulative gas production were evaluated using the Gompertz model:

$$Y = A * \exp(-B * \exp(-k * \text{temp})),$$

Wherein: Y = cumulative gas production (mL/g); A= maximum gas production (mL); B= lag time before onset of exponential gas production (h); K= specific gas production rate (mL/h) at time (h) ⁽²⁹⁾.

At the end of each predetermined fermentation period (2, 6, 12, 24, 48, and 72 h), flasks were removed from the incubator, and medium pH was immediately measured. Apparent dry matter degradability of the substrate was determined by removing nylon bags ⁽²⁷⁾ at the same incubation times. After removal, flasks were immediately refrigerated to halt microbial activity. Nylon bags were then washed under running water, dried for 12 h in a forced-air oven at 55 °C, followed by an additional 2 h at 105 °C, and subsequently weighed. Dry matter degradability was calculated as the difference between bag weight containing the sample before incubation and weight after incubation.

Model parameters were estimated using SAS statistical software ⁽³⁰⁾ through the nonlinear regression procedure (PROC NLIN). Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the general linear model procedure (PROC GLM) of SAS. Treatment means were compared using Tukey's test at a 5% significance level.

Results and discussion

The crude extract obtained from purple mombin leaves (*Spondias purpurea* L.) contained alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and terpenes, as identified in the present study. Similar findings were reported by Marisco et al. ⁽³¹⁾, who evaluated different solvents for extraction of bioactive compounds from *Spondias purpurea* L. leaves. Those authors observed that the ethanolic extract exhibited greater phytochemical diversity than extracts obtained using chloroform, chloroform–methanol, and ethyl acetate, in which some compounds were absent.

Similar bioactive profiles reported in extracts from other plant species highlight the critical role of extraction methods in shaping final chemical composition. Oliveira et al. ⁽³²⁾ analyzed an aqueous extract of *Moringa oleifera* leaves and identified saponins, flavonoids, tannins, alkaloids, and total phenols. Similarly, Baihaqi et al. ⁽³³⁾ reported that aqueous extracts of *Carica pubescens* seeds contained tannins, flavonoids, alkaloids, saponins, and steroids, besides demonstrating wide distribution of these compounds across diverse plant species.

Efficiency of bioactive compound extraction is influenced by several factors, including solvent polarity, particle size, temperature, extraction time, and extraction technique ⁽³⁴⁾. These variables affect not only yield but also diversity of phytochemicals recovered. Such compounds play essential roles in plant defense and exhibit diverse biological activities that can directly affect microbial populations ⁽³⁵⁾.

Chemical complexity of plant extracts, characterized by presence of multiple bioactive compounds, highlights their potential as sources of functional molecules ⁽³⁶⁾. These compounds may interact with ruminal microorganisms, altering metabolic pathways and influencing efficiency of nutrient utilization in ruminant animals.

Table 2 presents parameter estimates of the Gompertz model for *in vitro* gas production, including maximum gas production potential (A), colonization time (B), and specific gas production rate (K) after 72 h of incubation.

Table 2. Estimated *in vitro* gas production parameters for control, extract, and monensin treatments.

Parameter	Treatment			<i>p</i> -value	SEM
	Control	Extract	Monensin		
A	126.59b	161.26a	126.76b	< 0.0001	2.81
B	4.12a	3.81b	3.43b	0.0325	0.098
K	0.076a	0.067b	0.061c	< 0.0001	0.001

A – Maximum gas production potential, in mL/g DM; B - Colonization lag time, in hours (h); K – Specific gas production rate, in hours. Values within the same row followed by different letters differ significantly among treatments according to Tukey's test ($p < 0.05$). The *p*-value indicates level of statistical significance, and SEM represents standard error of the mean.

Maximum gas production potential (A) differed significantly among treatments ($p < 0.0001$). The extract treatment showed a higher value (161.26 mL g⁻¹ DM) than both monensin (126.76 mL g⁻¹ DM) and the control (126.59 mL g⁻¹ DM). The enhanced response observed with the extract may be associated with presence of alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and terpenes identified in the crude extract of *Spondias purpurea* L. leaves.

Monensin maintained a gas production potential similar to that of the control, indicating inhibition of fermentative activity. Russell and Strobel⁽³⁷⁾ described the ability of monensin to inhibit hydrogen-producing Gram-positive bacteria, thereby reducing gas accumulation without impairing digestion. Plant-derived metabolites can selectively modulate ruminal microbiota, favoring fermentative efficiency⁽³⁸⁾. The use of plant extracts may increase total gas production through enhanced fermentation or reduce gas output, particularly methane, via modulation of methanogenic microorganisms^(39,40).

In the rumen, alkaloids exhibit activity against specific microbial groups, reducing populations of methanogenic protozoa and archaea and directly influencing fermentative processes. Lower availability of hydrogen for methanogenesis redirects metabolic flux toward propionate production, a more energetically efficient volatile fatty acid, thereby reducing methane emissions⁽⁴¹⁾.

Flavonoids exert antimicrobial activity through multiple mechanisms, including disruption of the cytoplasmic membrane, inhibition of nucleic acid synthesis and energy metabolism, and interference with cell wall integrity^(42,43). These compounds interact with nucleophilic sites in peptidoglycan, rendering Gram-positive bacteria more susceptible because of the higher proportion of this component in their cell walls⁽⁴⁴⁾. As a result, flavonoids reduce populations of Gram-positive bacteria while favoring propionate-producing Gram-negative bacteria, thereby promoting beneficial shifts in ruminal fermentation^(45,46).

Tannins can modulate the ruminal ecosystem by reducing populations of protozoa and methanogenic archaea, contributing to lower ammonia and methane production and a reduced acetate-to-propionate ratio⁽⁴⁷⁾. Their antimicrobial activity occurs through several mechanisms, including inhibition of bacterial and fungal enzymes, formation of complexes with enzyme substrates, and interaction with cell membranes, leading to metabolic disruption⁽⁴⁸⁾.

Suppression of cellulolytic bacteria reduces fiber degradation and acetate formation, thereby decreasing hydrogen availability for methanogenesis^(49,50). In addition, tannins exhibit affinity for structural carbohydrates due to their phenolic hydroxyl groups, forming complexes that limit substrate accessibility to microbial fermentation⁽⁵¹⁾. These compounds also form

stable complexes with dietary proteins in the rumen, increasing the fraction of protein that escapes ruminal degradation and becomes available for intestinal digestion ⁽⁵²⁾.

Saponins act in the rumen by forming complexes with sterols in protozoal cell membranes, increasing membrane permeability, and leading to cell rupture and lysis. This process, known as defaunation, refers to reduction or elimination of the ruminal protozoan population. However, defaunation effects may be transient, as saponins can be metabolized by ruminal microorganisms into sapogenins, which are biologically inactive ⁽⁵³⁾.

Reduction of ruminal protozoa enhances bacterial protein synthesis and slows down ruminal protein turnover, resulting in greater flow of bacterial nitrogen to the duodenum. This reduction also influences methane production, as many methanogenic archaea exist in symbiotic association with protozoa and rely on hydrogen released during protozoal metabolism to sustain methanogenesis. Consequently, defaunation reduces hydrogen availability, limiting methanogenic activity ⁽⁵⁴⁾.

Essential oils consist primarily of isoprene derivatives, including monoterpenes and sesquiterpenes, as well as low-molecular-weight aromatic compounds ⁽⁵⁵⁾. Terpenoids comprise monoterpenes (C10), sesquiterpenes (C15), and, to a lesser extent, diterpenes (C20) ^(56,57). Their bioactive constituents destabilize membranes of protozoa and Gram-positive bacteria through mechanisms similar to those of ionophores ⁽⁵⁸⁾. Owing to their hydrophobic nature, terpenoid cyclic hydrocarbons accumulate within bacterial lipid bilayers, disrupting membrane integrity and increasing permeability. This disruption promotes ion translocation and collapse of ionic gradients, increasing cellular energy expenditure and potentially leading to cell death when metabolism is redirected to restore ionic balance ⁽⁵⁹⁾.

A primary mechanism involves inhibition of bacterial adhesion to feed particles, which reduces amino acid deamination and ruminal ammoniacal nitrogen (N-NH₃) production. Associated reductions in ruminal pH further modify the fermentative profile, as more acidic conditions suppress fibrolytic bacteria and favor amylolytic populations, resulting in increased propionate production ⁽⁶⁰⁾.

Colonization lag time (B) also differed among treatments ($P = 0.0325$). Monensin (3.43 h) and the plant extract (3.81 h) reduced colonization time relative to the control (4.12 h), corresponding to reductions of 16.74% and 7.52%, respectively. These results indicate that both additives accelerated onset of fermentation. According to Oliveira et al. ⁽⁶¹⁾, colonization time reflects the interval between microbial adhesion to feed particles and initiation of effective substrate degradation, constituting a key determinant of microbial growth dynamics. Thus,

shorter colonization time indicates more rapid microbial attachment and earlier access to fermentable substrates by overcoming structural barriers of the feed matrix ⁽⁶²⁾.

Specific gas production rate (K), which reflects fermentation intensity after the initial phase, differed significantly among treatments ($P < 0.0001$). The control exhibited the highest rate (0.076 h^{-1}), followed by the plant extract (0.067 h^{-1}), whereas monensin showed the lowest rate (0.061 h^{-1}). These results suggest that although monensin accelerated onset of fermentation (lag time = 3.43 h), it subsequently moderated fermentative activity, leading to reduced gas production over time.

Despite exhibiting the longest colonization time (4.12 h), the control treatment showed more rapid and intense fermentation. Extended colonization may reflect lower selective pressure on microbial populations, allowing establishment of more diverse communities before peak fermentation ⁽⁶³⁾. The plant extract produced an intermediate response, characterized by reduced colonization time (3.81 h) and moderate growth rate, suggesting selective effects of its bioactive compounds on ruminal microorganisms.

Cumulative gas production increased over time in all treatments (Figure 1), with the extract showing the highest total gas volume after 72 h of incubation. Elevated gas production likely reflects increased organic matter digestibility, given the strong correlation between gas volume and degradability of incubated substrates ⁽⁶⁴⁾.

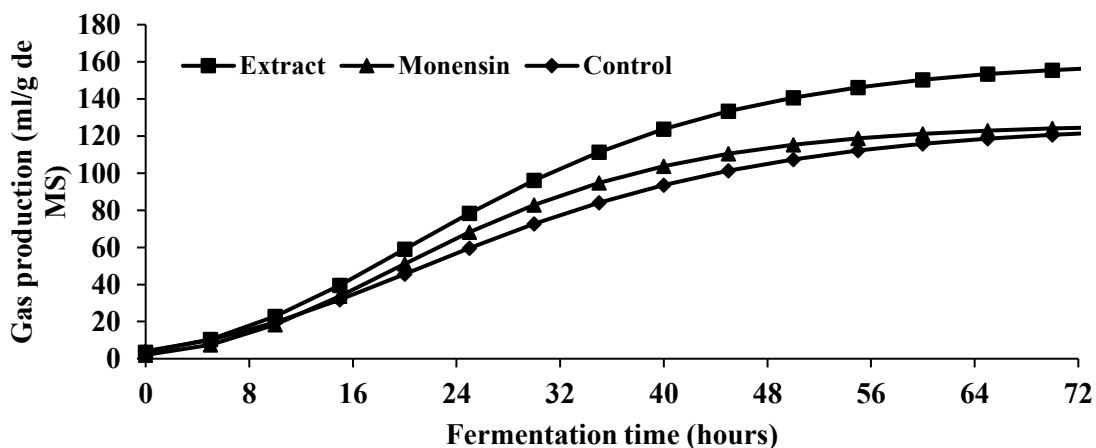


Figure 1. Cumulative gas production (mL) over 72 h of *in vitro* fermentation for extract, monensin, and control treatments.

In contrast, monensin significantly reduced gas production, indicating greater regulation of microbial activity, which likely limited cumulative gas production over time. The control treatment exhibited intermediate values, reflecting baseline fermentation of the substrate in the absence of additives. As shown in Table 3, no significant differences in dry matter (DM) degradability were observed among treatments at incubation times of 2 h ($P = 0.3115$), 6 h (P

= 0.5091), 12 h ($P = 0.9470$), and 48 h ($P = 0.4576$). At 24 h ($P = 0.0239$), the extract treatment showed greater DM degradability ($452.75 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$) than both the control ($415.41 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$) and monensin ($418.30 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$). At 72 h ($P = 0.0402$), DM degradability with the extract ($569.31 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$) did not differ from monensin ($563.83 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$) but remained higher than that of the control ($528.39 \text{ g kg}^{-1} \text{ DM}$).

Table 3. Apparent dry matter degradability ($\text{g kg}^{-1} \text{ DM}$) over incubation time for control, extract, and monensin treatments.

Incubation time (hours)	Treatment			<i>p</i> -value	SEM
	<i>In vitro</i> DM degradability (%)				
	Control	Extract	Monensin		
2	311.72	317.97	295.22	0.3115	5.11
6	336.14	353.59	348.19	0.5091	5.58
12	381.64	380.28	379.78	0.9470	2.36
24	415.41b	452.75a	418.30b	0.0239	2.94
48	477.64	490.03	490.23	0.4576	4.35
72	528.39b	569.31a	563.83ab	0.0402	3.81

Values within the same row followed by different letters differ significantly among treatments according to Tukey's test ($p < 0.05$). *P*-value indicates level of statistical significance, and SEM represents standard error of the mean.

Results indicate that the extract significantly influenced ruminal fermentation and dry matter (DM) degradability, exhibiting a distinct response compared with monensin and the control. Increased gas production was accompanied by greater DM degradability, particularly at 24 and 72 h of incubation (Figure 2). This response suggests that the effect of the extract persisted throughout the fermentation period. Alvarado-Ramírez et al. ⁽⁶⁵⁾ reported that enhanced gas production may be associated with greater availability of fermentable substrates promoted by plant extracts.

In vitro DM degradability increased linearly over incubation time in all treatments. Lack of differences among treatments at early incubation times (2, 6, and 12 h) indicates that effects of additives became more evident during the medium and long term of fermentation.

Diets or substrates with greater fermentative potential may reduce time required for degradability, as increased availability of readily fermentable compounds favors early microbial colonization and accelerates DM degradation rates. Mertens ⁽⁶⁷⁾ emphasized that feed fermentability and microbial colonization rate directly determine ruminal fermentation dynamics. Higher initial production of volatile fatty acids in rapidly fermentable substrates intensifies ruminal degradation during early incubation stages ⁽⁶⁸⁾. However, despite faster initial fermentation, total degradability ultimately depends on maintenance of ruminal pH, as

excessively acidic conditions impair fibrolytic bacterial activity and can limit degradation of the fibrous fraction over time.

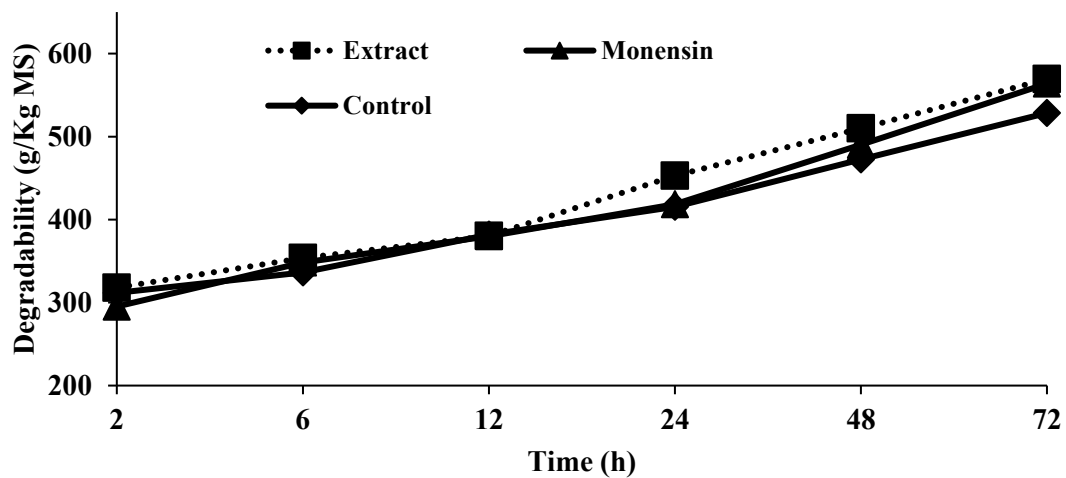


Figure 2. Dry matter degradability (g kg^{-1} DM) throughout fermentation time (72 h) for control, extract, and monensin treatments

Abd'Quadri-Abojukoroum et al. ⁽⁶⁸⁾ evaluated ethanolic leaf extracts over 48 h of incubation and reported that lemon (*Citrus limon*) extract exhibited the highest gas production (140 mL g^{-1} DM) and dry matter degradability (385 g kg^{-1} DM), values that did not differ from the control (104 mL g^{-1} DM and 382 g kg^{-1} DM). In contrast, monensin markedly reduced gas production and degradability (66 mL g^{-1} DM and 327 g kg^{-1} DM).

In the present study, treatments did not affect ruminal pH; however, incubation time significantly influenced mean values, which ranged from 6.59 to 7.06 (Table 4). Maintenance of pH within this range is essential for sustaining efficient ruminal fermentation and microbial activity. Absence of treatment effects indicates that neither the plant extract nor monensin disrupted ruminal environmental balance, representing a favorable condition for nutrient digestibility.

Table 4. Ruminal pH values over the incubation period for control, extract, and monensin treatments

Treatment	Incubation time (hours)						<i>p</i> -value	SEM
	2	6	12	24	48	72		
	pH							
Control	7.04aA	6.82abA	6.82abA	6.73bA	6.64bA	6.64bA	0.0019	0.0545
Extract	7.06aA	6.80bA	6.78bcA	6.70bcA	6.54dA	6.64cdA	<.0001	0.0329
Monensin	7.04aA	6.79bcA	6.85bA	6.70cdA	6.66deA	6.59eA	<.0001	0.0229
	P-value							
	0.9792	0.2282	0.2941	0.4190	0.3021	0.4019		

Values within the same row followed by different lowercase letters differ significantly among treatments according to Tukey's test ($P < 0.05$). Identical uppercase letters within the same column indicate no significant difference among

treatments at each incubation time according to Tukey's test ($P > 0.05$). The p -value indicates level of statistical significance, and SEM represents standard error of the mean.

Progressive pH reduction over incubation may indicate intensification of microbial fermentation, increasing production of short-chain fatty acids (SCFAs) ^(69, 70). Baihaqi et al. ⁽³³⁾ reported pH values from 6.81 to 6.86 during *in vitro* incubation with aqueous *Carica pubescens* extract, with no significant changes observed even at extract concentrations up to 5%. Similarly, Abd'Quadri-Abojukoroum et al. ⁽⁶⁸⁾ observed that pH remained within the normal range of 6.0 to 7.0 after 16 and 48 h of incubation using *Themeda triandra* hay and 22 ethanolic plant extracts.

Neutral detergent fiber (NDF) content of the experimental diet in the present study may have contributed to maintenance of pH over time. Hassan et al. ⁽⁷¹⁾ emphasized that dietary fiber plays a key role in modulating the ruminal environment and stabilizing pH in the rumen. *In vivo*, physically effective fiber stimulates chewing activity and salivary secretion, enhancing ruminal pH buffering capacity. In contrast, *in vitro* systems lack salivary input and rely on buffer solutions to partially simulate saliva function. Consequently, pH stability under *in vitro* conditions depends primarily on buffer composition, substrate fermentation rate, and gradual accumulation of SCFAs.

Although mean pH decreased across all treatments, a more pronounced decline was observed in the extract treatment, particularly at later incubation times. This response is consistent with cumulative gas production and dry matter degradability results, indicating greater fermentative activity in the presence of the extract. Despite this trend, pH values remained within the optimal range for ruminal fermentation throughout the incubation period (Figure 3).

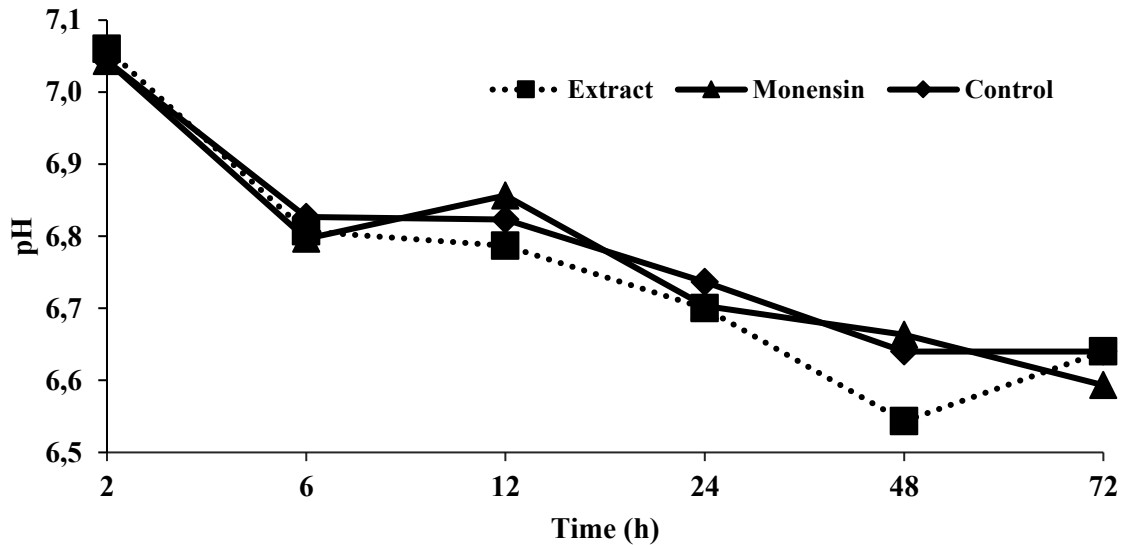


Figure 3. Ruminal pH values over the fermentation period (72 hours) for control, extract, and monensin treatments.

In contrast, the monensin treatment exhibited smaller pH variation over time, likely reflecting its modulatory effect on ruminal microbiota. This monensin response has been described by Thomas ⁽⁷²⁾, who highlighted its ability to reduce organic acid production by specific microbial populations, thereby stabilizing the ruminal environment. Monensin acts by disrupting ion transport in Gram-positive bacteria, reducing lactic acid production, and promoting propionate formation ⁽⁷³⁾.

Unlike monensin, plant extracts influence ruminal pH through multiple mechanisms. Previous studies indicate that inclusion of plant extracts can increase pH by reducing lactic acid and short-chain fatty acid (SCFA) concentrations, contributing to a more stable ruminal environment. In the case of cinnamon extract, which is rich in phenols, tannins, and flavonoids, increased acetate-to-propionate ratio, and higher gas and SCFA production have been reported, resulting in greater pH variation during incubation ⁽⁷⁴⁾.

Overall, these findings suggest that both monensin and plant extracts can modulate ruminal fermentation without compromising pH stability. However, fermentative profiles differed among treatments, indicating distinct modes of action. These interpretations should be considered preliminary and warrant further investigation.

Conclusion

The ethanolic extract of *Spondias purpurea* L. modulated ruminal fermentation under *in vitro* conditions, increasing gas production and dry matter degradability. In addition, the extract reduced microbial colonization lag time while maintaining pH within an appropriate

range for ruminal fermentation. These preliminary findings indicate potential of this extract as a natural modulator of ruminal fermentation. Further studies should quantify bioactive compounds and evaluate different inclusion levels, with emphasis on effects on short-chain fatty acid profiles, methane production, ammoniacal nitrogen, fiber and non-fibrous carbohydrate degradability, as well as validation using *in vivo* experiments.

Declaration of conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Declaration of data availability

Data will be provided upon request to the corresponding author.

Authors' contributions

Conceptualization: Lima, E.H.S. Pedreira, M.S. Silva, G.M. Methodology: Lima, E.H.S. Pedreira, M.S. Silva, G.M. Investigation: Lima, E.H.S. Rios, G.G. Amorim, J.M.S. Data curation: Lima, E.H.S. Amorim, J.M.S. Formal analysis: Lima, E.H.S. Nascimento, L.M.G. Writing (original draft): Lima, E.H.S. Funding acquisition: Pedreira, M.S. Writing (revision and editing): Pedreira, M.S. Silva, G.M. Nascimento, L.M.G. Resources: Silva, G.M. Rios, G.G, Evangelista, V.S.S

Declaration of use of generative AI

During preparation of this manuscript, the authors used ResearchRabbit and SciSpace to assist in identifying and organizing relevant scientific literature. All content was subsequently reviewed by the authors, who assume full responsibility for the manuscript.

References

1. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, Mcsweeney CS. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27(5):663-693. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00072-X).
2. Mahesh MS, Mohini M. Crop residues for sustainable livestock production. *Adv Dairy Res.* 2014;2:e108. Available at: <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000e108>.
3. Ulfina G, Lemma F, Tekalign T, Amanuel B. Rumen manipulation: one of the promising strategies to improve livestock productivity – review. *Dairy Vet Sci J.* 2019;9(2):555758. Available at: <https://doi.org/10.19080/JDVS.2019.09.555758>.
4. Suriyapha C, Pongsub S, Sommai S, Wongtangtong E, Chuenwarin W, Phaikaao L, Saetiew K, Rattanasuwan P. In vitro fermentation characteristics, microbial changes and gas production of microencapsulated phytonutrient pellets at varying dietary crude protein

- levels. Sci Rep. 2025;15:11214. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95748-7>.
5. Ungerfeld EM. Metabolic hydrogen flows in rumen fermentation: principles and possibilities of interventions. Front Microbiol. 2020;11:589. Available at: [doi:10.3389/fmicb.2020.0058](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.0058).
 6. Bergen WG, Bates DB. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. J Anim Sci. 1984;58(6):1465-1483.
 7. Saraiva MMS, Lim K, Do Monte DFM, Givisiez PEN, Alves LBR, De Freitas Neto OC, et al. Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. Braz J Microbiol. 2022.
 8. Martin C, Morgavi D, Doreau M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Animal. 2010;4(3):351-365.
 9. Hodgson J. Grazing management: science into practice. Longman; 1990.
 10. Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Cornell University Press; 1994.
 11. Franco GL, Barros LF, Rocha MST, Medeiros LQ, D'Oliveira MC, Diogo JMS, Ramos AKB. Suplementação proteico-energética sobre o consumo voluntário e parâmetros ruminais em novilhos. Rev Bras Saúde Prod An. 2010;11(2):371-385
 12. Jamarun N, Pazla R, Zain M, Arief A. Comparison of in vitro digestibility and rumen fluid characteristics between the tithonia (*Tithonia diversifolia*) with elephant grass (*Pennisetum purpureum*). IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2019;287:012019. Available at: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/287/1/012019>.
 13. Ahmed E, Fukuma N, Hanada M, Nishida T. The efficacy of plant-based bioactives supplementation to different proportion of concentrate diets on methane production and rumen fermentation characteristics in vitro. Animals. 2021;11:1029. Available at: <https://doi.org/10.3390/ani11041029>.
 14. Engels C, Gräter D, Esquivel P, Jiménez VM, Gänzle MG, Schieber A. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. Food Res Int. 2012.
 15. Njoku PC, Akumefula MI. Phytochemical and nutrient evaluation of *Spondias mombin* leaves. Pakistan J Nutr. 2007;6(8):613-615.
 16. Mazza PHS, Jaeger SMPL, Silva FL, Lima AGVO, Hora DC, Barbosa AM, Andrade EA, Silva Júnior JM, Bezerra LR, Oliveira RL. Effects of dietary inclusion of dry umbu fruit pulp residue (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) on intake, ingestive behaviour, digestibility, nitrogen balance and ruminal pH in sheep. J Anim Feed Sci. 2022;31(1):55–64. Available at: <https://doi.org/10.22358/jafs/146396/2022>

17. Eniolorunda OO, Awojobi HA, Ettu RO, Agunbiade JA, Oyekunle MA. Effect of *Spondias mombin* on intake and digestibility in West African Dwarf sheep fed graded levels of whole cassava root meal-based diets. *Assiut J Agric Sci.* 2015;46(6):27–34.
18. Harborne J. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* 2nd ed. London: Chapman and Hall; 1984.
19. Raaman N. *Phytochemical techniques.* New Delhi: New India; 2006.
20. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. *Official methods of analysis.* 18th ed. Gaithersburg: AOAC; 2007.
21. Mertens DR. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J AOAC Int.* 2002;85:1217-1240. Available at: <https://doi.org/10.1093/jaoac/85.6.1217>.
22. Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. *J Anim Sci.* 1992;70:3562-3577.
23. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci.* 1991;74:3583-3597.
24. Theodorou MK, et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol.* 1994;48:185-197.
25. De Jesus Pereira TC, Pereira MLA, Moreira JV, et al. Effects of alkaloid extracts of mesquite pod on the products of in vitro rumen fermentation. *Environ Sci Pollut Res.* 2017;24:4301-4311. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7761-3>.
26. Maurício RM, et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Feed Sci Technol.* 1999;79:321-330.
27. Menezes DR, Costa RG, Araújo GGL, et al. Cinética ruminal de dietas contendo farelo de mamona destoxificado. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2015;67(2):636-641.
28. Figueiredo MP, et al. Determinação da relação entre a pressão e volume através da fermentação da raiz de mandioca tratada com uréia, feno de tifton 85 e silagem de milho para instalação da técnica in vitro de produção de gases. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40., 2003, Santa Maria. Anais...* Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia; 2003.
29. Laird AK. Dynamics of relative growth. *Growth.* 1965;29:249-263.
30. SAS Institute Inc. *User's Guide, version 9.2.* Cary, NC: SAS Institute Inc.; 2001.

31. Marisco G, Santos RX, Aguiar R, Brendel M, Pungartnik C. Antifungal potential of terpenes from *Spondias purpurea* L. leaf extract against *Moniliophthora perniciosa* that causes witches broom disease of *Theobroma cacao*. *Int J Complement Altern Med*. 2017;7(1):00215. Available at: <https://doi.org/10.15406/ijcam.2017.07.00215>.
32. Oliveira IST, Fernandes T, Santos ARD, González Aquino C, Vega Britez GD, Vargas Junior FM. Phytochemical composition and effects of aqueous extracts from *Moringa oleifera* leaves on in vitro ruminal fermentation parameters. *Ruminants*. 2025;5(1):4. Available at: <https://doi.org/10.3390/ruminants5010004>.
33. Baihaqi ZA, Widiyono I, Angeles AA, Suwignyo B, Nurcahyo W. Anthelmintic activity of *Carica pubescens* aqueous seed extract and its effects on rumen fermentation and methane reduction in Indonesian thin-tailed sheep: An in vitro study. *Veterinary World*. 2023;16(7):1421-1428. Available at: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1421-1428>.
34. Madanahall Ramesh M, Shankar NS, Venkatappa AH. Driving/critical factors considered during extraction to obtain bioactive enriched extracts. *Pharmacognosy Reviews*. 2024;18(35):68-81. Available at: <https://doi.org/10.5530/phrev.2024.18.7>.
35. Yelugudari B, Mesram N, Karnati PT. 9-Hexadecenoic acid rich HPLC fraction of *Pithecellobium dulce* methanolic seed extract exhibits potential anti-inflammatory activity by inhibiting IL-8, IL-6, and PGE2: phytochemical characterization, in-vitro and in-vivo evaluation. *Journal of Research in Pharmacy*. 2023;27(5):1733-1750. Available at: <https://doi.org/10.29228/jrp.458>.
36. Ali MAMM. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Pulicaria crispa* aerial parts extract. *Asian Journal of Basic Science & Research*. 2020;2(2):9-14. Available at: <https://doi.org/10.38177/AJBSR.2020.2202>.
37. Russell JB, Strobel HJ. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989;55(1):1-6. Available at: <https://doi.org/10.1128/aem.55.1.1-6.1989>.
38. Patra AK, Saxena J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 2010;71(11-12):1198-1222. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010>.
39. Kholif AE, Anele UY, Patra AK, Varadyova Z. Editorial: The use of phytogenic feed additives to enhance productivity and health in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021;8:685262. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.685262>.
40. Choi Y, Lee Y, Lee SJ, Kim HS, Eom JS, Jo SU, Lee SS. Dose-response effects of *Poncirus trifoliata* extract on in vitro ruminal methane production, fermentation, and microbial abundance. *Italian Journal of Animal Science*. 2022;21(1):595-604. Available at: <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2034540>.
41. Santos ET, Pereira MLA, Silva CFP, Souza-Neta LC, Geris R, Martins D, Santana AEG, Barbosa LCA, Silva HGO, Freitas GC, Figueiredo MP, Oliveira FF, Batista R. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its

- influence on in vitro ruminal digestion. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14(4):8496-8516. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms14048496>
42. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38:99–107.
 43. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial activities of flavonoids: structure–activity relationship and mechanism. *Curr Med Chem*. 2015;22:132–149.
 44. Babii C, Mihalache G, Bahrin LG, Neagu A, Birsa LM, Gostin I, Mihai CT, Sa L, Stefan M. A novel synthetic flavonoid with potent antibacterial properties: in vitro activity and proposed mode of action. *PLoS One*. 2018;13:1–15.
 45. Oskoueian E, Abdullah N, Oskoueian A. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *Biomed Res Int*. 2013;1–8.
 46. Seradj AR, Abecia L, Crespo J, Villalba D, Fondevila M, Balcells J. The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high-concentrate diets. *Anim Feed Sci Technol*. 2014;197:85–91.
 47. Cieslak A, Zmora P, Pers-Kamczyc E, et al. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis-idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim Feed Sci Technol*. 2012;176:102–106.
 48. Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 1991;30(12):3875-3883. Available at: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)83426-L](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)83426-L)
 49. Patra AK, Saxena J. The effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr Res Rev*. 2009;22:204–219.
 50. Bodas R, Prieto N, García-González R, et al. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim Feed Sci Technol*. 2012;176:78–93.
 51. Patra AK, Saxena J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J Sci Food Agric*. 2011;91:24–37.
 52. Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric*. 2006;86:2010–2037.
 53. Ramos-Morales E, de la Fuente G, Duval S, et al. Antiprotozoal effect of saponins in the rumen can be enhanced by chemical modifications in their structure. *Front Microbiol*. 2017;8:1–13.
 54. Jayanegara A, Wina E, Takahashi J. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: influence of addition levels and plant sources. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2014;27:1426–1435.

55. Cobellis G, Marinucci MT, Yu Z. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: a review. *Sci Total Environ.* 2016;545–546:556–568.
56. Benchaar C, Chaves AV, Fraser GR, et al. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. *Can J Anim Sci.* 2007;87:413–419.
57. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, et al. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Anim Sci.* 2007;90:2580–2595.
58. Castillejos L, Calsamiglia S, Ferret A. Effect of essential oil active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. *J Dairy Sci.* 2006;89(7):2649–2658. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72341-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72341-4).
59. Chao SC, Young DG, Oberg CJ. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *J Essent Oil Res.* 2000;12:639–649.
60. Wallace RJ, McEwan NR, McIntosh FM, et al. Natural products as manipulators of rumen fermentation. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2002;15:1458–1468.
61. Oliveira JS, Zanine ADM, Santos EM. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. *Revista Eletrônica de Veterinária.* 2007;8(6):1-12
62. Valadares Filho SC, Pina DS. Fermentação ruminal. In: Berchielli TT, Pires AV, Oliveira SG, editores. *Nutrição de ruminantes.* 2. ed. Jaboticabal: Funep; 2011. p. 151-176.
63. Xie X, Wang JK, Liu JX, et al. Temporal microbial colonization on different forages is driven by the rumen environmental conditions. *Animal Microbiome.* 2025;7:46. Available at: <https://doi.org/10.1186/s42523-025-00407-x>
64. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development.* 1988;28:7-55.
65. Alvarado-Ramírez ER, Maggiolino A, Elghandour MMY, Rivas-Jacobo MA, Ballesteros-Rodea G, Palo PD, Salem AZM. Impact of co-ensiling of maize with *Moringa oleifera* on the production of greenhouse gases and the characteristics of fermentation in ruminants. *Animals.* 2023;13(764). Available at: <https://doi.org/10.3390/ani13040764>.
66. Mertens, DR. Rate and extent of digestion. *Journal of Dairy Science.* 1993;76(12):323-333. Available at: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77730-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77730-9)
67. Owens, FN, Goetsch AL. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: Milligan LP, Grovum WL, Dobson A, eds. *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1986. p. 196-226.

68. Abd'Quadri-Abojukoro AN, Nsahlai IV. Evaluating the effects of some selected medicinal plant extracts on feed degradability, microbial protein yield, and total gas production in vitro. *Animals*. 2023;13(702). Available at: <https://doi.org/10.3390/ani13040702>.
69. Wei X, Ouyang K, Long T, Liu Z, Li Y, Qiu Q. Dynamic variations in rumen fermentation characteristics and bacterial community composition during in vitro fermentation. *Fermentation*. 2022;8(6):276. Available at: <https://doi.org/10.3390/fermentation8060276>
70. Zhang M, Liang G, Zhang X, Lu X, Li S, Wang X, Yang W, Yuan Y, Jiao P. The gas production, ruminal fermentation parameters, and microbiota in response to *Clostridium butyricum* supplementation on in vitro varying with media pH levels. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:960623. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.960623>
71. Hassan F, Arshad MA, Ebeid HM, Rehman MS, Khan MS, Shahid S, Yang C. Phytogetic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet–microbe interaction. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:575801. Available at: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801>.
72. Thomas EE. Field responses to the feeding of Rumensin®. Elanco Animal Health. 2006.
73. Chalupa W, Corbett W, Brethour JR. Effects of monensin and amichloral on rumen fermentation. *Journal of Animal Science*. 1980;51(1):170-179. Available at: <https://doi.org/10.2527/jas1980.511170x>.
74. Ahmed MG, Al-Sagheer AA, El-Zarkouny SZ, et al. Potential of selected plant extracts to control severe subacute ruminal acidosis in vitro as compared with monensin. *BMC Veterinary Research*. 2022;18:356. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03457>

IV - CAPÍTULO II

EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Spondias purpurea* L. SOBRE A CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS E A DEGRADABILIDADE RUMINAL *IN VITRO*

RESUMO

Aditivos naturais ricos em fitoquímicos têm sido investigados como alternativas aos ionóforos para a modulação da fermentação ruminal. Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos do extrato etanólico das folhas de *Spondias purpurea* L. sobre a fermentação ruminal *in vitro*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos: monensina e níveis crescentes do extrato (0, 8, 12, 16 e 20%). O extrato etanólico das folhas de seriguela (*Spondias purpurea* L.) (EESP) intensifica a atividade fermentativa, promovendo aumento da fração potencialmente degradável da matéria seca e da fibra, além de reduzir a fração indigestível em comparação à monensina. Observou-se alteração no padrão fermentativo, com aumento na produção de propionato e modulação do butirato, indicando redirecionamento das vias metabólicas associado a maior eficiência energética. Embora o pH ruminal tenha reduzido linearmente com a inclusão do EESP, os valores permaneceram dentro da faixa considerada adequada. Os resultados indicam que a dose de 8% do EESP foi suficiente para promover alterações fermentativas semelhantes às obtidas com os níveis mais elevados de inclusão. A produção de gases foi superior nos tratamentos com o EESP em relação à monensina, sugerindo menor efeito inibitório sobre os microrganismos fibrolíticos. Em contraste, a monensina reduziu a produção total de gases e a degradabilidade da fração fibrosa, confirmando seu efeito seletivo sobre a microbiota ruminal. Os resultados demonstram que o EESP modula a fermentação ruminal *in vitro*, ao aumentar a degradação dos substratos e alterar as vias fermentativas, sem comprometer a estabilidade do ambiente ruminal. Esses achados indicam seu potencial como alternativa natural aos ionóforos, sendo necessários estudos adicionais para avaliar seus efeitos sobre a emissão de metano, a síntese da proteína e o desempenho animal em condições *in vivo*.

Palavras-chave: aditivos naturais, compostos secundários, extrato vegetal, monensina, seriguela.

ETHANOLIC EXTRACT OF *Spondias purpurea* L. LEAVES ON GAS PRODUCTION KINETICS AND RUMINAL DEGRADABILITY *IN VITRO*

ABSTRACT

Natural additives rich in phytochemicals have been investigated as alternatives to ionophores for modulating ruminal fermentation. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of the ethanolic extract of *Spondias purpurea* L. leaves on *in vitro* ruminal fermentation. The experimental design was completely randomized, with six treatments: monensin and increasing levels of the extract (0, 8, 12, 16, and 20%). The ethanolic extract of *Spondias purpurea* L. leaves (EESP) intensifies fermentative activity, promoting an increase in the potentially degradable fraction of dry matter and fiber, in addition to reducing the indigestible fraction compared to monensin. An alteration in the fermentative pattern was observed, with an increase in propionate production and modulation of butyrate, indicating a redirection of metabolic pathways associated with greater energy efficiency. Although ruminal pH decreased linearly with the inclusion of EESP, the values remained within the range considered adequate. The results indicate that the 8% dose of EESP was sufficient to promote fermentative changes similar to those obtained with the higher inclusion levels. Gas production was higher in the EESP treatments compared to monensin, suggesting a smaller inhibitory effect on fibrolytic microorganisms. In contrast, monensin reduced total gas production and the degradability of the fibrous fraction, confirming its selective effect on the ruminal microbiota. The results demonstrate that EESP modulates ruminal fermentation *in vitro* by increasing substrate degradation and altering fermentative pathways, without compromising the stability of the ruminal environment. These findings indicate its potential as a natural alternative to ionophores, but further studies are needed to evaluate its effects on methane emission, protein synthesis, and animal performance under *in vivo* conditions.

Keywords: natural additives, secondary compounds, plant extract, monensin, seriguela.

1. Introdução

O uso de aditivos de origem vegetal como moduladores da fermentação ruminal tem ganhado destaque como alternativa sustentável e segura aos aditivos químicos convencionais. Esse interesse decorre da necessidade de reduzir a dependência de compostos sintéticos e mitigar problemas associados ao seu uso, como o desenvolvimento de resistência microbiana (Ahmed et al., 2024).

Além disso, essa abordagem se insere no contexto da crescente preocupação com a segurança alimentar e o bem-estar animal, bem como das restrições regulatórias ao uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal, especialmente na União Europeia (Diretiva 1831/2003/CE; Comissão Europeia, 2003) (Ayyat et al. 2021).

Nesse cenário, os fitoquímicos emergem como alternativa promissora, uma vez que apresentam reconhecida segurança para a saúde humana e para o meio ambiente, sendo classificados como geralmente reconhecidos como seguros (Generally Recognized as Safe – GRAS). Essa característica favorece sua aceitação e aplicação em sistemas produtivos (Michalak et al., 2021), estimulando a investigação de diversas plantas e seus extratos pelo potencial de melhorar o desempenho produtivo de ruminantes, reduzir custos de produção e mitigar impactos ambientais, em consonância com os princípios da agricultura sustentável (Iommelli et al., 2025).

Entre os fitoquímicos de maior interesse na nutrição de ruminantes destacam-se os compostos secundários de origem vegetal, como taninos, saponinas, alcaloides e óleos essenciais, amplamente estudados devido às suas propriedades antimicrobianas e ao seu potencial modulador da fermentação ruminal, os quais podem promover benefícios à saúde animal, melhorar a eficiência fermentativa e contribuir para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa (Jafari et al., 2019).

Apesar dos avanços, a eficácia dos aditivos vegetais apresenta elevada variabilidade, sendo influenciada pela fonte botânica, pela concentração e pela natureza dos compostos bioativos, além da composição da dieta basal. Essa complexidade evidencia a necessidade de estudos integrados que aprofundem o entendimento das relações estrutura atividade desses compostos e subsidiem estratégias mais eficientes para o manejo da fermentação ruminal (Patra; Saxena, 2009).

As folhas do gênero *Spondias* apresentam um perfil diversificado de metabólitos secundários bioativos, incluindo taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides e compostos fenólicos (Njoku e Akumefula, 2007), o que confere às espécies desse gênero potencial relevante para aplicação na nutrição de ruminantes.

Dentre essas espécies, a *Spondias purpurea* L., pertencente à família Anacardiaceae, destaca-se pela ampla distribuição em regiões tropicais e pela adaptação às condições edafoclimáticas de regiões semiáridas e tropicais (Souza & Mendes, 2026), características que reforçam seu potencial de utilização como aditivo fitogênico em sistemas de produção animal.

Entretanto, ainda são escassos os estudos que avaliem os efeitos do extrato de *Spondias purpurea* L. sobre a dinâmica da fermentação ruminal, particularmente em relação à degradabilidade dos substratos e ao perfil dos produtos fermentativos.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar os efeitos do nível crescente de extrato etanólico das folhas de *Spondias purpurea* L. sobre a fermentação ruminal *in vitro* com ênfase na cinética fermentativa, na degradabilidade dos nutrientes e nas alterações do perfil fermentativo, em comparação a monensina.

2. Material e métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), no campus de Vitória da Conquista, Bahia. Os procedimentos experimentais submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CEUA-UESB), com o número de protocolo 245/2024. As folhas da seriguela (*Spondias purpurea* L.) foram coletadas, devidamente identificadas e o material depositado no herbário da UESB. Imediatamente após a colheita, as folhas transportadas e realizado o procedimento de secagem do material vegetal em estufa com circulação de ar (± 40 °C) e, em seguida maceradas com um pistilo, para posterior obtenção do extrato vegetal.

Para a preparação do extrato, amostras de 100 gramas das folhas foram exaustivamente extraídas com etanol (99,9%), em ciclos de 72 horas cada. Após cada extração, o material foi filtrado em papel filtro e concentrado em um evaporador rotativo sendo submetido a triagem química qualitativa para presença de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e terpenos. Os alcaloides foram detectados pelo teste de Dragendorff. O extrato etanólico da planta (2 mL) e ácido clorídrico diluído (0,2 mL) foram colocados em um tubo de ensaio. Após a adição de 1 mL do reagente de Dragendorff, o precipitado marrom-alaranjado indicou a presença de alcaloides. Os flavonoides foram detectados pela adição de algumas gotas de ácido clorídrico concentrado a uma pequena quantidade da solução do extrato. O aparecimento imediato de uma coloração vermelha indicou a presença de flavonoides. Os taninos foram detectados pelo teste com cloreto férrico. O extrato etanólico (0,5 g) foi dissolvido em água destilada (5 a 10 mL) e filtrado. Algumas gotas de solução de cloreto férrico a 5% foram adicionadas ao filtrado. A

formação de um precipitado verde-escuro confirmou a presença de taninos. As saponinas foram identificadas por meio da diluição de 1 mL do extrato vegetal em 20 mL de água destilada, seguida de agitação no vortex, utilizando-se proveta graduada, durante 15 minutos. A formação de uma camada de espuma (aproximadamente 1 cm) indicou a presença de saponinas. O teste de Salkowski foi utilizado para detectar terpenoides. O extrato (5 mL) foi misturado com clorofórmio (2 mL) e ácido sulfúrico concentrado (3 mL) foi cuidadosamente adicionado até formar uma camada. A formação de uma coloração marrom-avermelhada na interface indicou resultado positivo para a presença de terpenoides (Harbone, 1984; Raaman, 2006).

Os ingredientes utilizados para confecção da dieta incubada foram feno de tifton 85, milho moído e farelo de soja. Todos os ingredientes moídos em moinho de facas tipo Willey, utilizando peneiras de crivo de 1,0 mm. A composição química dos alimentos e da dieta experimental encontra-se na Tabela 1. Os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM) foram estimados de acordo com AOAC, 2007. Para a estimação da fibra em detergente neutro (FDN) utilizou-se a metodologia empregada por Mertens et al. 2002. Os carboidratos totais (CT) foram estimados por meio da equação proposta por Sniffen et al. (1992), $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ e os carboidratos não-fibrosos (CNF) segundo Van Soest et al. (1991), $CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)$.

Tabela 1. Composição química dos ingredientes e da ração experimental

Item	Ingredientes			
	Feno de tifton	Milho moído	Farelo de soja	Dieta experimental
<i>Composição química (g/kg MS)</i>				
Matéria seca	895,4	875,6	885,8	883,5
Matéria mineral	66,7	9,2	65,3	38,2
Proteína bruta	59,4	77,1	487,0	161,8
Extrato etéreo	14,2	38,1	9,6	31,2
Fibra em Detergente neutro	848,1	157,5	225,9	333,6
Fibra em Detergente ácido	498,2	25,4	49,7	137,4
Hemicelulose	349,9	132,1	176,2	196,3
Carboidratos totais	859,7	875,6	438,2	768,8
Carboidratos não fibrosos	11,6	718,2	212,3	435,1
<i>Proporção dos ingredientes da dieta (g/kg MS)</i>				
Dieta experimental	308,0	492,0	200,0	

O líquido ruminal utilizado como inoculante nos ensaios de produção de gás foi obtido de duas vacas mestiças holandesas (650 ± 50 kg de peso vivo), portadoras de cânula ruminal.

Os animais possuíam livre acesso à água sendo alimentados, durante 15 dias antes do início do experimento, com uma dieta à base de capim-elefante, suplementada diariamente com concentrado composto por milho moído, farelo de soja e suplemento mineral.

O líquido ruminal foi coletado de diferentes partes do rúmen e posteriormente filtrado através de gases, armazenado em garrafas térmicas previamente aquecidas a 39°C e encaminhados ao laboratório. O líquido coletado dos animais doadores foram misturados em proporções iguais, sendo continuamente purgados com CO₂, para manter as condições de anaerobiose.

O meio de incubação foi preparado conforme descrito por Theodorou et al. (1994). Assim, a mistura foi preparada com 500 mL de água destilada, 200 mL da solução tampão, 200 mL da solução de macrominerais, 60 mL do agente redutor e 0,1 mL da solução de microminerais e o indicador “resazurina” na solução redutora. Essa mistura levemente agitada e saturada com CO₂ gasoso para atingir pH entre 6,8 – 6,9 e obter coloração rósea.

Os ingredientes da ração testada foram moídos (granulometria de 1 mm) e pesados separadamente em sacos de náilon (5 × 10 cm), com porosidade de 50 µm, na proporção de 1 g de ração por saco. Os sacos foram acondicionados em frascos de vidro com capacidade de 160 mL. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos: monensina sódica, com inclusão de 5 µM (Jesus Pereira et al., 2017); 0%, 8%, 12%, 16% e 20% do extrato etanólico da *Spondias purpurea* L (EESP). Considerando a alta viscosidade do extrato, este foi previamente diluído em dimetilsulfóxido (DMSO). Em cada frasco, foram adicionados 87 mL do meio de incubação, acrescidos de 3 mL de DMSO puro nos tratamentos controle e monensina, ou 3 mL do EESP diluído em DMSO nas respectivas concentrações dos tratamentos, totalizando um volume final de 90 mL por frasco.

No laboratório a proporção de 9:1 (v:v) do meio tampão: o líquido ruminal (10 mL) foram inoculados nos frascos e aspergidos com CO₂, já com o substrato e vedados com tampa de borracha expansiva. Após a injeção do inóculo nos frascos, a agulha foi mantida fixada na tampa por alguns segundos, para que eventuais gases injetados ou mesmo formados dentro dos frascos fossem eliminados (pressão zero). Em seguida, os frascos foram manualmente agitados e colocados em estufa a 39°C (tempo zero). Os tratamentos foram em triplicata e além destes, incluídos três frascos contendo fluido ruminal e meio de incubação, que serviu como o branco.

A cinética de produção de gás foi avaliada através da técnica de produção de gás semiautomática proposta por Maurício et al. (1999) e modificada por Menezes et al. (2015). As pressões nos frascos foram medidas por um indicador de pressão por intermédio de um transdutor de pressão (Tipo T443A, Bailey e Mackey, Inglaterra) com uma agulha acoplada a

sua extremidade, inserindo através das tampas dos frascos uma agulha de 21G x 1” (0,80 x 25 mm) presa ao transdutor de pressão. As leituras de pressão (em psi – pressão por polegada quadrada) foram tomadas durante o período inicial da fermentação. A produção de gás registrada nos tempos 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 36; 48; 72 e 96 horas.

Os dados de pressão obtidos foram transformados em volume de gases, conforme a equação proposta por Figueiredo et al. (2003), para a altitude local:

$$V = -0,02 + 4,30p + 0,07 p^2, R^2 = 0,99$$

Em que: “V” é o volume (mL) e “p” é a pressão dos gases dentro dos frascos de fermentação (psi).

Para o cálculo dos parâmetros da produção de gases, os resultados mensurados foram ajustados de forma não linear, utilizando-se o modelo bi-compartimental proposto por Schofield, J, Pitt e Pell (1994), descrito a seguir:

$$V = Vf1 / (1 + \exp(2 - 4C1(T - L))) + Vf2 / (1 + \exp(2 - 4C2(T - L)))$$

Em que Vf1 equivale ao volume máximo de produção de gases dos carboidratos não fibrosos (CNF); C1 corresponde à taxa de degradação (%.h⁻¹) da mesma fração; Vf2 refere-se ao volume máximo de produção de gases da fração dos carboidratos fibrosos (CF); C2 representa a taxa de degradação (%.h⁻¹) dos CF; e T e L referem-se aos tempos de incubação (em horas) e à latência (em horas), respectivamente.

A avaliação dos parâmetros da fermentação ruminal foram realizados a partir do líquido de incubação coletado nos frascos da fermentação. O líquido então homogeneizado e o pH mensurado através da leitura direta potenciômetro digital portátil (K39-0014PA – KASVI). A degradabilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro (FDN) das rações foi determinada pela remoção dos sacos de náilon (Menezes et al., 2015). As determinações de pH e a retirada dos sacos de náilon foram realizadas nos tempos de 4, 8, 12, 24 e 96 horas de incubação. Assim, logo após a remoção, os frascos foram refrigerados para interromper a fermentação microbiana, sendo posteriormente os sacos lavados em água corrente e pesados após secagem por 12 horas em estufa de 55° C de ventilação forçada e 2 horas em estufa de 105° C, sem ventilação forçada.

A degradabilidade potencial da matéria seca e os parâmetros da cinética da degradabilidade ruminal foram estimados segundo modelo proposto por Ørskov & McDonald (1979), de acordo com a fórmula: $DP = a + b(1 - e^{-c \times t})$, em que “DP” é degradabilidade potencial; “a”, fração solúvel em água; “b”, fração potencialmente degradável; “c”, taxa de degradação da fração “b” (h⁻¹); e “t”, tempo de incubação (h). A degradabilidade efetiva (DE) das dietas foi calculada pela fórmula: $DE = a + (b \times c) / (c + k)$, em que “k” é a taxa de passagem

(Ørskov & McDonald, 1979). As taxas de passagem utilizadas foram de 2, 5 e 8% h⁻¹, para o cálculo da degradabilidade efetiva (AFRC, 1993).

Em outro frasco foram armazenados cerca de 10 mL de líquido ruminal e acidificadas com ácido sulfúrico 20% (1 mL de ácido: 10 mL do fluido) para mensuração do nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no tempo de 12 e 96 horas de incubação. As amostras armazenadas a -20 °C, descongeladas e centrifugadas a 3.000 rpm. Logo após, 2 mL do sobrenadante pipetados para determinação da concentração de N-NH₃, mediante destilação com hidróxido de potássio (KOH) 2N, conforme técnica de Fenner (1965), adaptada por Vieira (1980).

Para a análise dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), foram coletados uma alíquota de 10 mL do líquido ruminal e filtrado em uma peneira fina com gaze nos tempos de 12 e 96 horas de incubação, depois pipetado 2 mL do filtrado e acrescido 1 mL de solução de ácido metafosfórico a 20% (p/v). As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C. Posteriormente, o material foi centrifugado a 4 °C, por 15 minutos, a 13.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,25 µm (micropore) e transferido para frascos tipo vial, sendo, em seguida, realizada a análise AGCC.

A determinação e quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (acetato, propionato, butirato) foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando um cromatógrafo da marca SHIMADZU, modelo SPD-20A VP, acoplado a um detector de ultravioleta (UV), com o comprimento de onda ajustado para cada ácido analisado. Os parâmetros cromatográficos incluíram o uso de uma coluna analítica AMINEX HP87-H (Bio-Rad), com fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 39 °C. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 0,05 N, e o volume injetado de cada amostra foi de 20 µL. Para a manutenção do sistema, uma solução de limpeza da coluna de ácido sulfúrico 0,005 N e uma solução de limpeza do injetor de metanol grau HPLC 70% foram empregadas.

Os parâmetros avaliados no ensaio *in vitro* foram submetidos à análise estatística utilizando o software SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As estimativas dos parâmetros de cinética fermentativa de produção de gases e da degradabilidade foram obtidas por meios de modelos não lineares pelo método iterativo Gauss-Newton.

Os dados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, considerando-se os tratamentos como efeito fixo, de acordo com o seguinte modelo estatístico: $Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$, em que Y_{ij} representa a observação, μ corresponde à média geral, T_i o efeito do tratamento e ϵ_{ij} o erro aleatório.

Os efeitos dos níveis de EESP (0, 8, 12, 16 e 20%) foram avaliados por análise de regressão, sendo testados os efeitos linear e quadrático por meio de contrastes polinomiais

ortogonais. A monensina foi considerada como tratamento adicional e excluída da análise de regressão. Adicionalmente, foram realizados contrastes ortogonais para avaliar a comparação entre a monensina e a média dos níveis de inclusão do EESP de 0, 8 e 20%.

3. Resultados e discussão

O pH do meio fermentativo reduziu ($P = 0,001$) à medida que houve aumento do nível de inclusão do EESP. A redução foi de 6,71 para 6,66 referente ao tratamento sem o extrato e ao tratamento com 20% de inclusão, respectivamente (Figura 1).

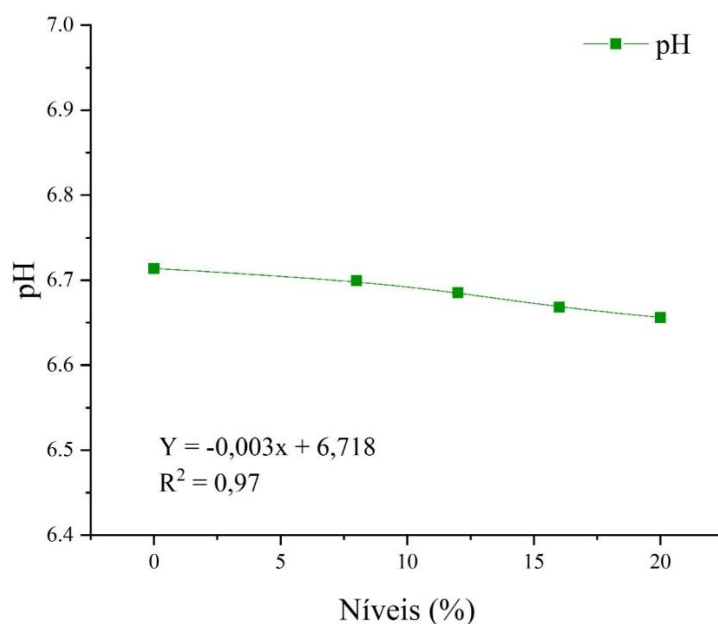


Figura 4. Valores do pH ruminal ao longo de 96 horas de fermentação *in vitro* em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias purpurea* L.

A análise de contrastes indicou que não houve diferença ($P > 0,05$) entre a monensina e o tratamento sem extrato e com 8% do EESP, porém foi observada diferença ($P = 0,04$) entre a monensina e o tratamento com 20% do EESP, indicando que níveis mais elevados de inclusão podem promover alterações mais pronunciadas no pH do meio fermentativo (Tabela 2).

Os resultados estão em consonância com os descritos por Wanapat et al. (2014), que apontam valores de pH entre 6,5 e 7,0 como ideais para a manutenção da estabilidade do ambiente ruminal e da eficiência fermentativa. O pH ruminal é um parâmetro importante, pois indica a homeostase interna do ambiente ruminal (Suriyapha et al., 2021).

A maior estabilidade do pH observada no tratamento com monensina sugere que o ionóforo exerceu um efeito modulador sobre a fermentação ruminal, contribuindo para a redução da acidificação do meio. Apesar da redução observada nos valores de pH com o aumento da inclusão do EESP, os valores ao longo do período de incubação permaneceram

dentro de uma faixa considerada adequada para a fermentação ruminal, não indicando risco de comprometimento da atividade microbiana.

Tabela 2. Parâmetros ruminais *in vitro* em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias Purpurea L.* ou monensina sódica

Tratamentos												
Itens	Dose do extrato					Monensina	EPM	Valor de P		Contrastes P - valor		
	0%	8%	12%	16%	20%			Linear	Quadrático	0	1	2
¹ pH	6,71	6,70	6,69	6,67	6,66	6,76	0,012	0,001*	0,573	0,38	0,23	0,04*
12 horas												
N-NH3 (mg/dL)	7,23	6,33	7,98	6,45	9,23	7,51	0,839	0,341	0,154	0,865	0,570	0,231
Acetato	3,68	4,08	4,98	4,47	5,31	5,20	0,935	0,916	0,185	0,079	0,622	0,062
² Propionato	2,26	2,46	2,59	3,38	3,62	2,07	0,470	0,006*	0,451	0,719	0,692	0,022*
Butirato	0,56	0,60	0,64	0,59	0,70	0,63	0,065	0,351	0,233	0,273	0,548	0,027*
A:P	1,65	1,66	1,92	1,35	1,75	2,53	0,114	0,089	0,293	0,106	0,988	0,846
96 horas												
N-NH3 (mg/dL)	12,40	15,42	19,02	16,06	14,74	18,91	0,839	0,106	0,790	0,009*	0,161	0,270
Acetato (mmol/l)	12,79	10,68	17,28	14,83	12,71	10,15	0,935	0,353	0,437	0,550	0,632	0,985
Propionato (mmol/l)	9,02	8,19	7,62	7,44	8,00	8,15	0,470	0,323	0,509	0,193	0,213	0,134
Butirato (mmol/l)	0,85	1,45	1,12	1,49	1,28	1,56	0,065	0,088	0,304	<,0001*	<,0001*	<,0001*
A:P	1,42	1,30	2,27	1,98	1,59	1,25	0,014	0,346	0,360	0,767	0,840	0,806

Dentro das linhas, médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05) pelo teste de Tukey. * Valores significativos a 5% de probabilidade (P < 0,05).

EPM – erro padrão da média.

A:P – Relação Acetato: propionato; Contrastes: 0 = Monensina vs. 0; 1 = Monensina vs. 8%; 2 = Monensina vs. 20%.

¹Equação $y = -0,003x + 6,718$ ($R^2 = 0,97$).

²Equação $y = 0,072x + 2,0562$ ($R^2 = 0,84$).

Resultados semelhantes foram relatados por Ahmed et al. (2021), que ao avaliarem a inclusão de um extrato de bioativos vegetais composto por *Allicin* (alho) em pó e extrato de *Citrus aurantium* (laranja), observaram redução do pH do meio fermentativo, com valores variando de 6,58 a 6,40.

Nowak et al. (2022), observaram uma diminuição linear no valor do pH com o aumento da concentração dietética do extrato de folhas de Paulowni, ambas após 24 horas de incubação. Por outro lado, Suriyapha et al. (2024), ao avaliarem pellets microencapsulados contendo casca de *Hylocereus undatus* (pitaya) associada ao *Cymbopogon citratus* (capim-limão), ricos em compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados, óleos essenciais e saponinas, em níveis de 0 a 4% da matéria seca do substrato, não observaram alterações significativas no pH ruminal, que permaneceu entre 6,85 e 6,93.

A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) às 12 horas de fermentação não foi influenciada ($P > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 2), porém, no tempo de 96 horas de incubação o tratamento com a monensina (18,91 mg/dL) foi superior ao tratamento sem extrato (12,40 mg/dL) ($P = 0,009$). Esse aumento pode estar relacionado à maior degradação das frações proteicas ao longo do tempo de incubação, o que favorece a liberação de amônia no meio ruminal. Do ponto de vista nutricional, a concentração de N-NH_3 no rúmen é considerada um importante indicador da disponibilidade de nitrogênio para o crescimento microbiano, uma vez que reflete o equilíbrio entre a degradação das proteínas da dieta e a utilização da amônia pelos microrganismos ruminais para síntese de proteína microbiana.

De acordo com Satter e Slyter (1974), bem como Murphy e Kennelly (1987), a microbiota ruminal é capaz de utilizar eficientemente o nitrogênio amoniacal para a síntese de proteína microbiana quando suas concentrações variam aproximadamente entre 6,3 e 27,5 mg/dL. Preston (1986) relata que a concentração mínima de amônia ruminal necessária para sustentar o crescimento bacteriano é de cerca de 5 mg/dL. Entretanto, valores superiores a 10 mg/dL são considerados mais adequados para maximizar a utilização do nitrogênio pelos microrganismos ruminais, favorecendo o aproveitamento da dieta (Leng, 1990).

A concentração de amônia no rúmen também é fortemente influenciada pela sincronização entre a degradação das frações proteicas e a disponibilidade de carboidratos fermentáveis. Quando há suprimento energético adequado, os microrganismos incorporam o N-NH_3 de forma mais eficiente para a síntese de proteína microbiana, reduzindo sua acumulação no meio. Por outro lado, em situações de limitação energética, essa incorporação é comprometida, favorecendo o acúmulo de amônia (Nocek e Russell, 1988).

Com base nisso, o maior valor de N-NH₃ observado no tratamento com monensina às 96 horas pode estar associado a um desbalanço entre a disponibilidade de energia e nitrogênio, resultando em menor eficiência de utilização do nitrogênio pelos microrganismos ruminais.

Para os ácidos graxos de cadeia curta, à medida que houve acréscimo do EESP, houve aumento da concentração de propionato às 12 horas ($P = 0,006$) (Figura 2). Adicionalmente, foi observada diferença ($P = 0,022$) entre monensina e o nível de 20% do EESP, indicando maior produção de propionato no nível mais elevado de inclusão do EESP (3,62) em comparação ao ionóforo (2,07) (Tabela 2).

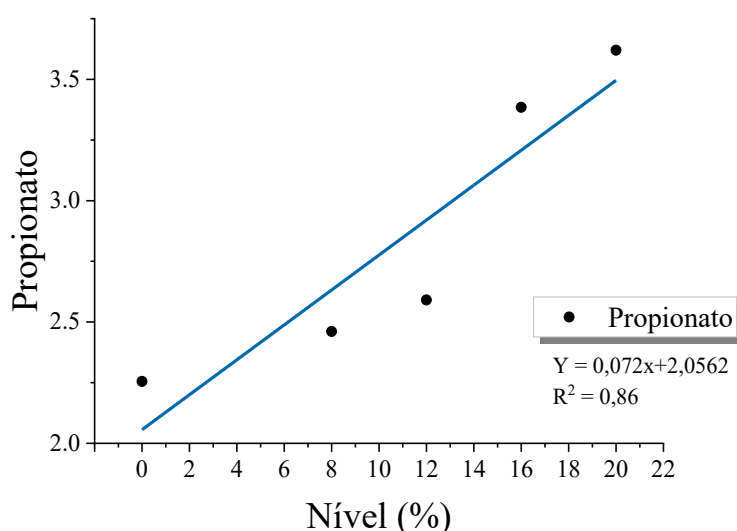


Figura 2. Valores de propionato ao longo de 96 horas de fermentação *in vitro* em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias purpurea* L.

Do ponto de vista fermentativo, a monensina é conhecida por favorecer a produção de propionato em detrimento de ácidos graxos como acetato e butirato, devido à sua ação seletiva sobre bactérias gram-positivas (Duffield et al., 2012). Assim, a diferença observada pode indicar que o EESP, especialmente em níveis mais elevados, promove alterações na composição da microbiota ruminal por mecanismos distintos daqueles exercidos pela monensina. Esse efeito pode estar relacionado à ação de compostos secundários bioativos presentes no EESP, os quais podem inibir ou estimular seletivamente determinados grupos microbianos envolvidos nas vias fermentativas, favorecendo alterações na produção de propionato. Dessa forma, o perfil fermentativo resultante sugere uma modulação da atividade microbiana ruminal associada à presença desses metabólitos vegetais.

O aumento da produção de propionato é considerado desejável do ponto de vista nutricional, uma vez que o ácido é o principal precursor da glicose em ruminantes por meio da gliconeogênese hepática (Gao; Qi, 2018). O resultado observado pode ainda refletir alterações

na microbiota ruminal, possivelmente associadas ao aumento da atividade de bactérias gram-negativas, as quais são relacionadas à produção de propionato (Bergen; Bates, 1984).

Para o butirato, o tratamento com 20% de EESP foi superior (0,70) ($P = 0,027$) ao tratamento com a monensina (0,63) às 12 horas, indicando um efeito pontual associado à maior dose de inclusão. Após 96 horas, foram observadas diferenças entre a monensina e os níveis do EESP (8% e 20%) ($P < 0,0001$) (Tabela 2). Os resultados indicam ausência de resposta dose dependente do EESP sobre a produção de butirato, sugerindo que seus efeitos são específicos de determinadas condições, enquanto a monensina apresenta ação mais estável.

O butirato é rapidamente absorvido no rúmen e amplamente metabolizado pelo epitélio ruminal, atuando como um importante substrato energético oxidativo para as células epiteliais (Baldwin; Jesse, 1996). Além disso, pode desempenhar papel relevante na saúde do epitélio ruminal, estimulando a proliferação e diferenciação celular, além de contribuir para a integridade da mucosa. Nesse sentido, a manutenção de sua produção, mesmo em condições de modulação fermentativa, pode representar um efeito fisiologicamente desejável. Contudo, a magnitude dos efeitos depende de fatores como a composição da dieta, a estrutura e densidade da microbiota e a dinâmica de passagem no sistema gastrointestinal (Li et al., 2012; Li et al., 2008).

A concentração de acetato e a relação acetato:propionato (A:P) não foram alteradas ($P > 0,05$) pelos níveis do EESP, indicando que, apesar do aumento na produção de propionato, o padrão da fermentação ruminal permaneceu relativamente estável (Tabela 2). A relação acetato (A) é frequentemente utilizada como um indicador indireto do potencial de produção de metano no rúmen. Isso ocorre porque a formação de acetato está associada à liberação de hidrogênio, enquanto a produção de propionato atua como uma via consumidora desse composto. Dessa forma, maiores valores da relação A tendem a refletir condições fermentativas mais favoráveis à metanogênese (Benchaar et al., 2014). Isso ocorre porque as vias de formação de acetato e butirato geram H_2 e CO_2 como subprodutos, os quais são utilizados por microrganismos metanogênicos na síntese de metano no rúmen (Nussio et al., 2006; Kozloski, 2009).

A produção de AGCC no rúmen é altamente dependente do grau e da taxa de fermentação (Cone; Becker, 2012). Além disso, as variações na produção dos metabólitos podem ser influenciadas pelas características da dieta, que afetam o pH ruminal, a microbiota e, conseqüentemente, a concentração de nitrogênio amoniacal e as proporções de AGCC (Faniyi et al., 2019). As concentrações de AGCC observadas no presente estudo mantiveram-se dentro das faixas consideradas fisiologicamente normais para o ambiente ruminal, variando de 54 a 74% para o acetato, 16 a 27% para o propionato e 6 a 15% para o butirato (Silva; Leão, 1979).

A degradabilidade diz respeito tanto à velocidade quanto ao grau em que os nutrientes do alimento, incluindo carboidratos, proteínas e outros polímeros, são quebrados em unidades mais simples pela ação da microbiota ruminal (Morgavi et al., 2010). Os parâmetros da degradação *in vitro* da matéria seca foram avaliados em função dos tratamentos experimentais (Tabela 3).

A fração solúvel (a) não foi influenciada ($P > 0,005$) pelos níveis do EESP ou pela monensina. Assim, os tratamentos experimentais não interferiram na disponibilidade imediata de substratos rapidamente degradáveis no início da incubação. A fração insolúvel potencialmente degradável (b) diferiu entre os tratamentos quando avaliada por contrastes. Os valores foram superiores nos tratamentos com EESP em relação à monensina, com diferenças nas comparações com as doses de 8% ($P = 0,004$) e 20% ($P = 0,001$). Esse padrão indica que a monensina pode ter limitado a extensão da degradação da fração fibrosa, possivelmente em função de sua ação seletiva sobre bactérias gram-positivas, muitas das quais estão associadas à degradação de componentes estruturais da dieta.

A redução pode ser atribuída possivelmente aos efeitos inibitórios da monensina sobre populações microbianas celulolíticas, como *Ruminococcus flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, espécies-chave no processo de degradação da fibra (Tedeschi et al., 2021; Yeoman et al., 2021). Como ionóforo, a monensina reduz essas populações bacterianas, limitando a degradação da parede celular vegetal (Marques; Cooke, 2021). Em contraste, o EESP parece ter favorecido a manutenção da atividade da microbiota fibrolítica, refletindo-se em uma maior fração potencialmente degradável da matéria seca.

Apesar das diferenças observadas na fração insolúvel potencialmente degradável (b), a taxa de degradação dessa fração (c) não diferiu entre os tratamentos com EESP e a monensina quando avaliados por contrastes. Entretanto, a análise de regressão evidenciou efeito quadrático ($P = 0,039$), observou-se redução da taxa de degradação em doses intermediárias do EESP ($0,02 \text{ h}^{-1}$ nas inclusões de 8 e 12%) em relação ao controle ($0,04 \text{ h}^{-1}$), seguida de recuperação parcial em níveis mais elevados ($0,03 \text{ h}^{-1}$ em 16 e 20%).

A estimativa do ponto de mínimo em 16,5% indica o nível de inclusão no qual a taxa de degradação atinge seu menor valor, correspondendo à menor velocidade de degradação da fração fibrosa. O resultado pode indicar que o EESP exerce maior efeito sobre a dinâmica de degradação da fibra em níveis intermediários a elevados, reduzindo a velocidade de atuação dos microrganismos sobre o substrato.

Tabela 3. Parâmetros do modelo de degradabilidade da matéria seca *in vitro* em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias Purpurea L.* ou monensina sódica

Itens	Tratamentos						EPM	Valor de P		Contrastes P - valor		
	Dose do extrato					Monensina		Linear	Quadrático	0	1	2
	0%	8%	12%	16%	20%	5 ppm						
a %	37,72	37,2	37,77	35,79	35,15	36,03	3,243	0,472	0,098	0,276	0,731	0,110
b %	22,60	29,52	30,24	24,6	31,87	26,61	5,291	0,769	0,464	0,058	0,004*	0,001*
¹ c %	0,04	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	< 0,001	0,743	0,039*	0,921	0,186	0,350
DE2%/h	51,80	52,77	52,20	50,81	52,06	52,74	0,569	0,437	0,309	0,157	0,146	0,681
DE5%/h	37,74	37,22	37,78	35,81	35,17	36,05	0,569	0,471	0,098	0,276	0,730	0,110
DE8%/h	37,74	37,22	37,78	35,81	35,17	36,05	3,227	0,471	0,098	0,276	0,730	0,109
DP96%/h	59,12	64,42	62,64	59,06	63,82	61,55	0,658	0,988	0,794	0,132	0,005*	0,010*
I%	39,67	33,28	31,98	39,60	32,98	37,36	5,787	0,959	0,209	0,266	0,009*	0,007*

EPM – erro padrão da média; a - fração solúvel; b - fração insolúvel potencialmente degradável; c - taxa de degradação da fração insolúvel potencialmente degradável b; DE - degradabilidade efetiva; kp - taxas de passagem em 2, 5, 8% h⁻¹; DP48h - degradabilidade potencial em 48 horas de incubação *in vitro*; I - fração indigestível.

* Valores significativos a 5% de probabilidade (P < 0,05).

Contrastes: 0 = Monensina vs. 0; 1 = Monensina vs. 8%; 2 = Monensina vs. 20%.

¹Equação y = 0,0001x²-0,0033x+0,0391 (R²=0,84)

Do ponto de vista biológico, a redução na taxa de degradação pode estar associada à interação entre compostos presentes no EESP e a microbiota ruminal, afetando a atividade dos microrganismos envolvidos na degradação da fibra. Com isso a hipótese de que o EESP modulou a fermentação ruminal predominantemente por meio do aumento da extensão do substrato potencialmente degradável, e não pela aceleração da taxa de degradação da fração insolúvel.

Além disso, o padrão observado sugere uma resposta dose dependente da microbiota fibrolítica, possivelmente associada a um efeito inibitório transitório em doses intermediárias, seguido por adaptação ou seleção de populações microbianas capazes de manter a atividade de degradação em níveis mais elevados de inclusão do EESP.

As estimativas de degradabilidade efetiva da matéria seca foram calculadas considerando taxas de passagem de 2, 5 e 8% h⁻¹. Para a taxa de passagem de 2% h⁻¹ (DE2), os valores variaram entre 50,81 e 52,77%, não sendo observado efeito ($P > 0,005$) entre os tratamentos. Esse resultado indica que, sob condições de baixa taxa de passagem, a resposta da degradabilidade efetiva não ocorreu de forma proporcional aos níveis de inclusão do EESP.

Para a taxa de passagem 5% h⁻¹ (DE5), os valores oscilaram entre 35,17 e 37,78%, também sem efeito ($P > 0,005$). Assim, os níveis de inclusão do EESP, como na monensina, não promoveram alterações na degradabilidade efetiva da matéria seca, sugerindo maior estabilidade do processo fermentativo ruminal.

De forma semelhante ao observado para a DE5, a degradabilidade efetiva estimada para a taxa de passagem de 8% h⁻¹ (DE8) também não foi influenciada ($P > 0,005$) pelos tratamentos ou pelos contrastes, apresentando valores entre 35,17 e 37,78%. A ausência de efeitos reforça que, em condições de elevada taxa de passagem, o impacto dos compostos bioativos presentes no EESP sobre a degradabilidade efetiva tende a ser limitado, possivelmente em função do menor tempo de permanência do substrato no rúmen.

A degradabilidade potencial da matéria seca após 96 horas de incubação (DP96h) não apresentou efeito ($P > 0,005$) na análise de regressão. Já os contrastes evidenciaram maiores valores nos tratamentos com EESP em relação à monensina, as doses de 8% ($P = 0,005$) e 20% ($P = 0,010$), indicou maior extensão da degradação em períodos prolongados de incubação (Figura 3). O comportamento observado está alinhado ao aumento da fração potencialmente degradável (b), sugerindo maior disponibilidade de substrato ao longo do tempo. Em contraste, a monensina pode ter limitado a degradação de frações estruturais, em função de sua ação sobre bactérias gram-positivas associadas à degradação da fibra.

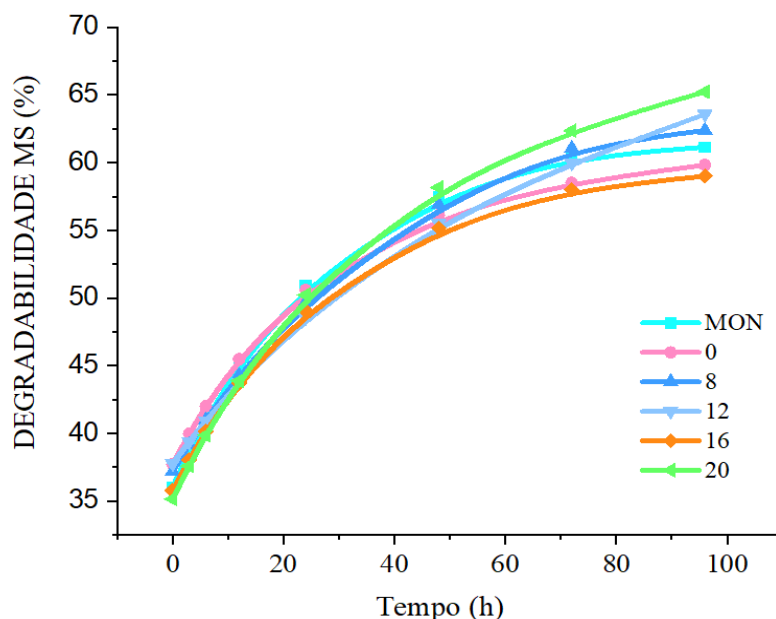


Figura 3. Degradabilidade *in vitro* da matéria seca (MS) da dieta total em função do tempo de incubação, sob níveis de inclusão do extrato da *Spondias purpurea* L. ou monensina sódica

A fração indigestível (I) diferiu nos tratamentos com EESP em comparação à monensina, as doses de 8% ($P = 0,009$) e 20% ($P = 0,007$). Tal resposta indica redução da fração não degradável da matéria seca, possivelmente associada à menor inibição da microbiota fibrolítica.

Uma hipótese plausível para esses padrões de fermentação é que os fitoquímicos presentes no EESP tenham modulado a atividade microbiana ruminal, promovendo alterações na dinâmica de degradação da fibra e, possivelmente, influenciando as taxas de passagem do substrato pelo rúmen (Patra et al., 2011; Cieslak et al., 2013).

A degradabilidade da fibra em detergente neutro (DFDN) foi influenciada pelos níveis de inclusão do EESP após 24 horas de incubação (Figura 4). Observou-se redução da DFDN ($P=0,006$) com o aumento dos níveis do EESP, passando de 55,85% no tratamento sem extrato para 52,92% no nível de 20%. A monensina apresentou menor DFDN em relação ao tratamento sem o extrato ($P=0,01$) e no nível de 8% ($P=0,003$), mas não diferiu do nível de 20% EESP ($P>0,05$) (Tabela 4).

O padrão demonstra que o aumento dos níveis de inclusão do EESP está associado à redução da degradabilidade da fração fibrosa, possivelmente em decorrência da ação de compostos bioativos sobre a dinâmica da fermentação ruminal. Além disso, no maior nível de inclusão, o EESP apresenta resposta semelhante à monensina após 24 horas de incubação.

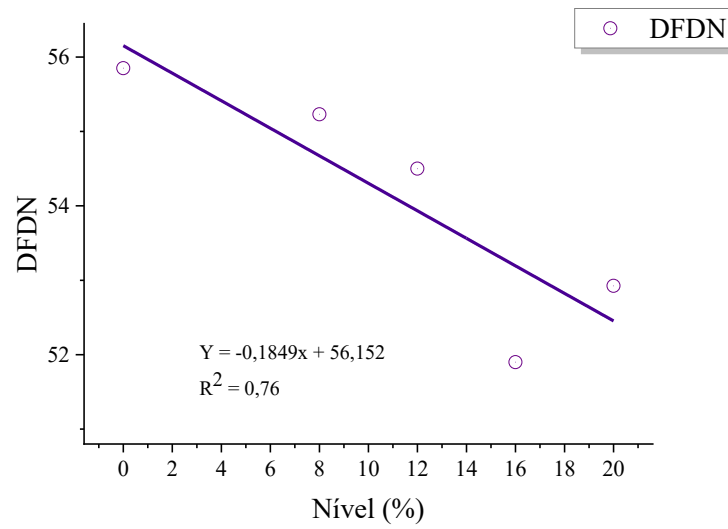


Figura 4. Degradabilidade da fibra em detergente neutro *in vitro* (DFDN) em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias purpurea* L. em 24 horas de incubação

Tabela 4. Degradabilidade da fibra em detergente neutro (FDN) *in vitro* em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias purpurea* L. ou monensina sódica

Itens	Tratamentos						EPM	Valor de P		Contrastes P - valor		
	Dose do extrato					Monensina		L	Q	0	1	2
DFDN	0%	8%	12%	16%	20%	5 ppm						
¹ 24 horas	55,85	55,23	54,50	51,90	52,92	52,16	1,757	0,006*	0,458	0,002*	0,007*	0,429
96 horas	74,63	77,40	75,45	70,19	75,16	71,20	1,958	0,615	0,359	0,013*	0,003*	0,005

DFDN - Degradabilidade da fibra em detergente neutro; EPM – erro padrão da média. * Valores significativos a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

Contrastes: 0 = Monensina vs. 0; 1 = Monensina vs. 8%; 2 = Monensina vs. 20%.

¹Equação $y = -0,1849x + 56,152$ ($R^2 = 0,76$)

Após 96 horas de incubação, não houve diferença ($P>0,05$) entre os níveis de inclusão do EESP para a DFDN, o que pode estar relacionado à adaptação da microbiota ruminal ou à redução da atividade dos compostos do EESP durante a incubação. A DFDN foi menor no tratamento com a monensina em relação ao tratamento sem extrato ($P=0,013$) e aos níveis de inclusão de 8% ($P=0,0003$) e 20% ($P=0,006$) do EESP (Tabela 4), o que é consistente com o perfil de produção de acetato, uma vez que a menor degradabilidade da fração fibrosa na presença da monensina tende a reduzir a formação do ácido graxo de cadeia curta, principal produto da fermentação de carboidratos estruturais.

A ação da monensina está relacionada à alteração do balanço iônico em bactérias gram-positivas, decorrente da modificação do transporte de íons através da membrana celular, o que compromete o gradiente de prótons e o pH intracelular, podendo levar à lise celular (Martin, 1998). O mecanismo descrito afeta diretamente populações fibrolíticas, como *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Butyrivibrio fibrisolvens* (Chen; Wolin, 1979), resultando em menor degradação da fração fibrosa.

Resultados semelhantes foram observados por Martello et al. (2019), que relataram redução na degradabilidade da FDN em 48 e 96 horas de incubação na presença da monensina comparado a uma dieta controle e com inclusão de taninos. A degradabilidade *in vitro* da FDN tem sido indicada como medida essencial para prever o consumo de matéria seca, os nutrientes digestíveis totais e a energia líquida das forragens. Um aumento de uma unidade nessa digestibilidade está associado a elevação de até 17% no consumo de matéria seca e a um aumento de mais de 24% na produção de leite corrigida para gordura *in vivo* (Oba et al., 1999).

Para os parâmetros relacionados à cinética de degradação *in vitro* dos carboidratos pela técnica de produção cumulativa, os diferentes níveis de inclusão do EESP não promoveram alterações ($P>0,05$) nas variáveis avaliadas. Em contrapartida, a monensina apresentou comportamento distinto em relação ao tratamento sem extrato e aos tratamentos com inclusão de 8% e 20% do EESP ($P<0,0001$), influenciando os parâmetros da cinética fermentativa avaliados (Tabela 5).

O volume máximo de gás proveniente da fração de carboidratos não fibrosos (Vf1) foi superior nos tratamentos sem extrato (45,12 mL g⁻¹) e com EESP vegetal nas doses de 8% (53,82 mL g⁻¹) e 20% (56,80 mL g⁻¹), quando comparados a monensina (41,61 mL g⁻¹) ($P<0,0001$) (Figura 5). Comportamento semelhante com os carboidratos fibrosos (Vf2), cujos valores também foram mais elevados nos tratamentos sem extrato (114,40 mL g⁻¹) e com EESP nas doses de 8% (115,60 mL g⁻¹) e 20% (118,90 mL g⁻¹), em relação à monensina (57,99 mL g⁻¹) ($P<0,0001$).

Tabela 5. Parâmetros da cinética de degradação de carboidratos *in vitro* em função dos níveis de inclusão do extrato da *Spondias Purpurea L.* ou monensina sódica, estimados pela técnica de produção cumulativa de gases

Tratamentos												
Itens	Dose do extrato					Monensina	EPM	Valor de P		Contrastes P - valor		
	0%	8%	12%	16%	20%			L	Q	0	1	2
Vf1 (mL g ⁻¹)	45,12	53,82	48,30	48,80	56,80	41,61	1,23	NS	NS	<,0001	<,0001	<,0001
C1 (h ⁻¹)	0,111	0,084	0,126	0,091	0,083	0,102	0,04	NS	NS	<,0001	<,0001	<,0001
L (h)	12,45	11,69	10,96	11,06	10,95	10,88	0,14	NS	NS	<,0001	<,0001	<,0001
Vf2 (mL g ⁻¹)	114,4	115,60	133,70	120,50	118,90	57,99	5,86	NS	NS	<,0001	<,0001	<,0001
C2 (h ⁻¹)	0,016	0,016	0,018	0,015	0,017	0,014	<.0001	NS	NS	<,0001	<,0001	<,0001
R ²	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99						

Vf1: volume máximo de gás da fração de CNF (carboidratos não fibrosos). C1: taxa de digestão para a fração de CNF. L: latência (lag time). Vf2: volume máximo de gás da fração de CF (carboidratos fibrosos). C2: taxa de digestão para a fração de CF. NS: não significativo.

Contrastes: 0 = Monensina vs. 0; 1 = Monensina vs. 8%; 2 = Monensina vs. 20%.

Os resultados observados são coerentes com o fato de que os carboidratos fibrosos apresentam maior potencial de geração de gás por unidade de substrato metabolizado quando comparados aos carboidratos não fibrosos (Johnson & Johnson, 1995).

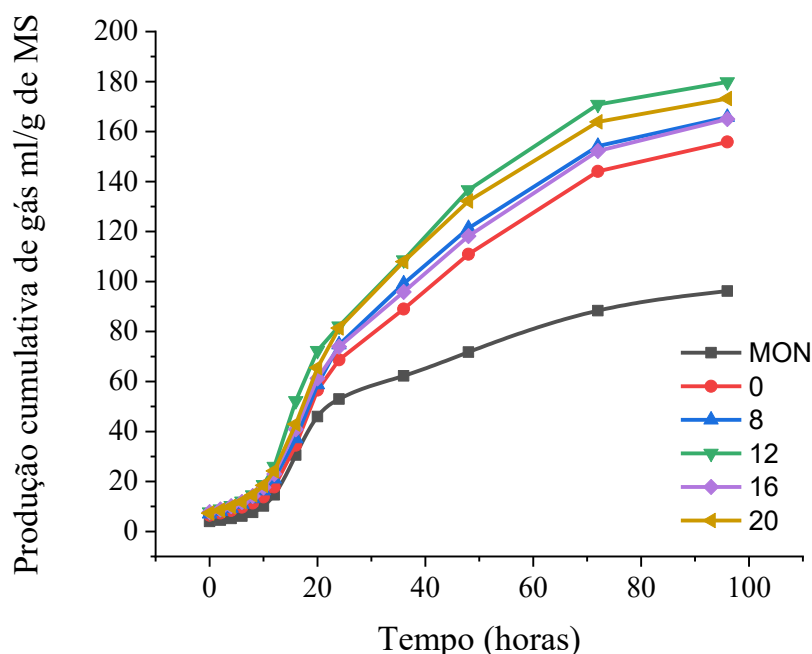


Figura 5. Produção cumulativa de gases *in vitro* em função do tempo para os níveis de inclusão do extrato etanólico de *Spondias purpurea* L. ou monensina sódica

A produção de gases acompanhou os resultados de degradabilidade da FDN, sendo maiores nos tratamentos com EESP após 96 horas em comparação à monensina. O padrão observado indica maior fermentação da fração estrutural, uma vez que a degradação da fibra está diretamente associada à produção de CO₂ e CH₄ no sistema *in vitro*.

Além disso, os resultados indicam que a monensina promoveu uma redução consistente na produção de gás associada a ambas as frações dos carboidratos. Esse efeito está relacionado ao seu mecanismo de ação como ionóforo poliéter, ao alterar a permeabilidade das membranas celulares, a monensina catalisa a troca de Na⁺ por H⁺, comprometendo o equilíbrio iônico intracelular e reduzindo a viabilidade de microrganismos sensíveis. Adicionalmente, pode interferir em processos celulares essenciais, como o transporte intracelular de proteínas associadas ao aparelho de golgi em células selecionadas (Łowicki & Huczyński, 2013), resultando na diminuição da atividade de protozoários e microrganismos metanogênicos no rúmen (Bach et al., 2023; Nørskov et al., 2023) e consequentemente menor produção de gás.

Resultados semelhantes foram relatados por Abd'Quadri-Abojukoroum et al. (2023), que observaram menor produção de gás com a inclusão de monensina em comparação ao

controle e a determinados extratos vegetais após 16 horas de fermentação *in vitro* do feno de *Themeda triandra*, corroborando o efeito inibitório da monensina sobre a fermentação ruminal observado no presente estudo.

A mensuração isolada da produção total de gases não é suficiente para inferir, de forma conclusiva, a eficácia do extrato em promover alterações na fermentação ruminal (Bunglavan et al., 2010). De fato, embora a produção total de gases seja frequentemente considerada um fator positivo e utilizada como um indicador indireto da digestibilidade do alimento, seu aumento nem sempre é desejável, uma vez que pode estar associado a maiores emissões de metano (Wischer et al., 2013).

A dinâmica do nitrogênio também ajuda a explicar os resultados encontrados. Após 96 horas, observou-se aumento nas concentrações de N-NH₃ nos tratamentos com EESP, o que indica maior disponibilidade de nitrogênio para a síntese microbiana. O suprimento de nitrogênio amoniacal é fundamental para o crescimento de bactérias fibrolíticas, que utilizam nitrogênio amoniacal, reforçando a relação entre maiores concentrações de N-NH₃ e a degradação da fibra.

Em relação ao tempo de latência (L), os tratamentos sem extrato (12,45h) e com EESP (8%=11,69h; 20%=10,95h) apresentaram tempos superiores aos observados para a monensina (10,88h) ($P<0,0001$), indicando atraso no início da fermentação. De acordo com de Jesus Pereira et al. (2017), o tempo necessário para o estabelecimento efetivo da colonização bacteriana durante a fermentação *in vitro* é influenciado por diversos fatores, incluindo o tipo de inóculo utilizado, as condições do ambiente ruminal, as características do fluido ruminal em função da dieta dos animais doadores e a eficiência dos procedimentos adotados na manipulação do líquido.

A redução do tempo de colonização está associada ao aumento da taxa de crescimento microbiano, uma vez que o período corresponde ao intervalo entre a adesão inicial dos microrganismos ao substrato, no início da incubação, e o início efetivo de sua degradação (Oliveira; Zanine; Santos, 2007). Assim, os menores valores de latência observados no tratamento com monensina sugerem maior rapidez no estabelecimento da fermentação ruminal.

A taxa de digestão da fração de carboidratos não fibrosos (C1) observados no tratamento sem o extrato (0,111 h⁻¹) foi superior ao da monensina (0,102 h⁻¹) ($P<0,0001$), resultando em maior taxa de digestão da fração não fibrosa. Em contrapartida, os tratamentos com EESP nas doses de 8% (0,084 h⁻¹) e 20% (0,083 h⁻¹) apresentaram valores inferiores ao da monensina (0,102 h⁻¹) ($P<0,0001$), indicando que o EESP promoveu redução na velocidade de fermentação dos carboidratos não fibrosos em relação ao ionóforo. A taxa de digestão da fração de

carboidratos fibrosos (C2) foi menor na presença da monensina ($0,014 \text{ h}^{-1}$) do que nos tratamentos sem o extrato ($0,016 \text{ h}^{-1}$) e com inclusão de 8% ($0,016 \text{ h}^{-1}$) e 20% ($0,017 \text{ h}^{-1}$) do EESP. Esses resultados indicam que, na ausência do ionóforo, a digestão da fração fibrosa ocorreu de forma mais rápida.

Santos et al. (2025), ao avaliarem o efeito da monensina sobre a fermentação ruminal *in vitro* da silagem de trigo em comparação a um grupo controle, não observaram diferenças no tempo de colonização (lag), porém a inclusão do ionóforo reduziu o volume de gás da fração fibrosa (Vf2) e a taxa de digestão dessa fração (C2). Os resultados corroboram aos encontrados nesta pesquisa e confirmam o efeito inibitório da monensina sobre a degradação da fibra (Marques e Cooke, 2021).

As diferenças observadas na taxa de digestão da fração fibrosa (C2) reforçam o papel dos extratos vegetais como moduladores da fermentação ruminal. Pesquisas indicam que os aditivos podem promover uma fermentação mais eficiente ao redirecionar o fluxo de hidrogênio e melhorar o equilíbrio entre produção de ácidos graxos voláteis, sem comprometer a digestibilidade da fibra (Hassan et al., 2020; Lambo et al., 2024).

Os resultados são coerentes com o comportamento do pH ruminal, que apresentou leve redução com o aumento dos níveis do EESP, mas permaneceu dentro da faixa adequada à atividade de microrganismos fibrolíticos. A manutenção desse padrão favorece a fermentação da fibra e contribui para a maior degradabilidade observada em tempos mais longos de incubação. Em contraste, a monensina apresentou pH ligeiramente superior, em concordância com a menor produção de gás e a menor atividade fermentativa.

Apesar da robustez do delineamento experimental e da relevância dos resultados, é importante reconhecer algumas limitações deste estudo. Uma delas é a ausência da quantificação dos componentes do EESP, CO_2 e metano no sistema de produção de gases *in vitro*, o que poderia fornecer informações adicionais para explicar melhor os resultados.

4. Conclusão

A inclusão do EESP altera a fermentação ruminal *in vitro*. Na cinética fermentativa da produção cumulativa de gases, não são observadas diferenças entre os níveis de inclusão avaliados. Os tratamentos contendo o EESP diferem da monensina, apresentando maior produção de gases e maior degradabilidade da fração fibrosa, enquanto a monensina promove menor atividade fermentativa e menor tempo de latência.

O EESP promove redução linear do pH, mantendo-o dentro da faixa adequada para a atividade microbiana ruminal, além de aumentar a degradabilidade potencial da matéria seca e reduzir a fração indigestível. Embora a degradabilidade da fibra em detergente neutro seja reduzida após 24 horas de incubação, após 96 horas os tratamentos contendo o EESP apresentam valores superiores aos observados para a monensina.

A dose de 8% do EESP demonstra potencial para modular a fermentação ruminal por apresentar resultados semelhantes aos observados nos níveis superiores para os parâmetros de fermentação e degradabilidade. Dessa forma, a inclusão de 8% representa uma alternativa promissora para utilização do extrato nas condições experimentais. Contudo, estudos adicionais são necessários para avaliar seus efeitos sobre a produção de metano e validar sua aplicabilidade em condições *in vivo*.

5. Referências bibliográficas

- AAbd'Quadri-Abojukoro, A. N.; Nsahlai, I. V. (2023). Evaluating the effects of some selected medicinal plant extracts on feed degradability, microbial protein yield, and total gas production in vitro. **Animals**, v.13, n.4, p.702. doi:10.3390/ani13040702
- AFRC - Agricultural and Food Research Council. (1993). Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford: **CAB International**.
- Ahmed, E.; Fukuma, N.; Hanada, M.; Nishida, T. (2021). The efficacy of plant-based bioactives supplementation to different proportion of concentrate diets on methane production and rumen fermentation characteristics in vitro. **Animals**, v.11, n.4, p.1029. doi:10.3390/ani11041029.
- Ahmed, M. G.; Elwakeel, E. A.; El-Zarkouny, S. Z.; Al-Sagheer, A. A. (2024). Environmental impact of phytobiotic additives on greenhouse gas emission reduction, rumen fermentation manipulation, and performance in ruminants: an updated review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.31, n.26, p.37943-37962. doi:10.1007/s11356-024-33664-5
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. (2007). Official methods of analysis. 18.ed. Gaithersburg, MD: **AOAC International**.
- Ayyat, M. S.; Al-Sagheer, A.; Noreldin, A. E.; Abd El-Hack, M. E.; Khafaga, A. F.; Abdel-Latif, M. A.; Salem, A. Z. M. (2021). Beneficial effects of rumen-protected methionine on nitrogen-use efficiency, histological parameters, productivity and reproductive performance of ruminants. **Animal Biotechnology**. doi:10.1080/10495398.2019.1653314
- Bach, A.; Elcoso, G.; Escartin, M.; Spengler, K.; Jouve, A. (2023). Modulation of milking performance, methane emissions, and rumen microbiome on dairy cows by dietary supplementation of a blend of essential oils. **Animal**, v.17, n.6, p.100825. doi:10.1016/j.animal.2023.100825
- Baldwin, R. L.; Jesse, B. W. (1996). Propionate modulation of ruminal ketogenesis. **Journal of Animal Science**, v.74, n.7, p.1694-1700. doi:10.2527/1996.7471694X.
- Benchaar, C.; Hassanat, F.; Gervais, R.; Chouinard, P. Y.; Petit, H. V.; Massé, D. I. (2014). Methane production, digestion, ruminal fermentation, nitrogen balance, and milk production of cows fed corn silage- or barley silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.2, p.961-974. doi:10.3168/jds.2013-7127.
- Bergen, W. G.; Bates, D. B. (1984). Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1465-1483. doi:10.2527/jas1984.5861465x.
- Bunglavan, S. J.; Valli, C.; Ramachandran, M.; Balakrishnan, V. (2010). Effect of supplementation of herbal extracts on methanogenesis in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**, v.22, art.216.
- Busquet, M.; Calsamiglia, S.; Ferret, A.; Kamel, C. (2005). Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.12, p.4393-4404. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73126-X.

Chen, M.; Wolin, M. J. (1979). Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.38, n.1, p.72-77. doi:10.1128/AEM.38.1.72-77.1979.

Cieslak, A.; Szumacher-Strabel, M.; Stochmal, A.; Oleszek, W. (2013). Plant components with specific activities against rumen methanogens. **Animal**, v.7, supl.2, p.253-265. doi:10.1017/S1751731113000852.

Cone, J. W.; Becker, P. M. (2012). Fermentation kinetics and production of volatile fatty acids and microbial protein by starchy feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v.172, p.34-41. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.006.

De Jesus Pereira, T. C.; Pereira, M. L. A.; Moreira, J. V.; et al. (2017). Effects of alkaloid extracts of mesquite pod on the products of in vitro rumen fermentation. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.5, p.4301-4311. doi:10.1007/s11356-016-7761-3.

Duffield, T. F.; Merrill, J. K.; Bagg, R. N. (2012). Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, v.90, n.12, p.4583-4592. doi:10.2527/jas.2011-5018.

Faniyi, T. O.; Adegbeye, M. J.; Elghandour, M. M. M. Y.; Pilego, A. B.; Salem, A. Z. M.; Olaniyi, T. A.; Adediran, O.; Adewumi, M. K. (2019). Role of diverse fermentative factors towards microbial community shift in ruminants. **Journal of Applied Microbiology**, v.127, n.1, p.2-11. doi:10.1111/jam.14236.

Figueiredo, M. P.; Maurício, R. M.; Pereira, L. G. R.; et al. (2003). Determinação da relação entre a pressão e volume através da fermentação da raiz de mandioca tratada com uréia, feno de tifton 85 e silagem de milho para instalação da técnica in vitro de produção de gases. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003. CD-ROM.

Gao, J.; Qi, Z. (2018). Absorption and metabolism of short chain fatty acids in ruminal epithelium. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, v.30, n.4, p.1271-1278.

Harborne, J. B. (1984). Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis (2nd ed.). **Chapman and Hall**.

Hassan, F. U.; Arshad, M. A.; Ebeid, H. M.; Rehman, M. S.; Khan, M. S.; Shahid, S.; Yang, C. (2020). Phytogetic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet-microbe interaction. **Frontiers in Veterinary Science**, v.7, p.575801. doi:10.3389/fvets.2020.575801.

Iommelli, P.; Spina, A. A.; Vastolo, A.; Infascelli, L.; Lotito, D.; Musco, N.; Tudisco, R. (2025). Functional and economic role of some Mediterranean medicinal plants in dairy ruminants' feeding: A review of the effects of garlic, oregano, and rosemary. **Animals**, v.15, n.5, p.657. doi:10.3390/ani15050657.

Jafari, S.; Emami, A.; Khorrami, B. (2019). Manipulation of rumen fermentation and methane gas production by plant secondary metabolites (saponin, tannin and essential oil): A review of ten-year studies. **Annals of Animal Science**, v.19, n.1, p.3-29. doi:10.2478/aoas-2018-0037.

Johnson, K. A.; Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.73, n.8, p.2483-2492. doi:10.2527/1995.7382483x.

Kozloski, G. V. (2009). **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. 214 p.

Lambo, M. T.; Ma, H.; Liu, R.; Dai, B.; Zhang, Y. (2024). Mechanism, effectiveness, and the prospects of medicinal plants and their bioactive compounds in lowering ruminants' enteric methane emission. **Animal**, v.18, n.4, p.101134. doi:10.1016/j.animal.2024.101134.

Leng, R. A. (1990). Factors affecting the utilization of poor-quality forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303. doi:10.1079/NRR19900016.

Li, R. W.; Wu, S.; Baldwin, R. L. VI; Li, W.; Li, C. (2012). Perturbation dynamics of the rumen microbiota in response to exogenous butyrate. **PLoS ONE**, v.7, n.1, e29392. doi:10.1371/journal.pone.0029392.

Li, F.; Hinderberger, J.; Seedorf, H.; Zhang, J.; Buckel, W.; Thauer, R. K. (2008). Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.3, p.843-850. doi:10.1128/JB.01417-07.

Łowicki, D.; Huczyński, A. (2013). Structure and antimicrobial properties of monensin A and its derivatives: Summary of the achievements. **BioMed Research International**, v.2013, art.742149. doi:10.1155/2013/742149.

Martello, H. F.; Paula, N. F.; Macedo, B. G.; Zervoudakis, J. T.; Brutti, D. D.; Carvalho, P.; Fonseca, M. A. (2019). Effects of tannins and monensin in a feedlot diet on in vitro ruminal fermentation. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, n.6, supl.2, p.3223-3232. doi:10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl2p3223.

Martin, S. A. (1998). Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, n.12, p.3123-3132. doi:10.2527/1998.76123123x.

Marques, R. D. S.; Cooke, R. F. (2021). Effects of ionophores on ruminal function of beef cattle. **Animals**, v.11, n.10, p.2871. doi:10.3390/ani11102871.

Maurício, R. M.; Mould, F. L.; Dhanoa, M. S.; Owen, E.; Channa, K. S.; Theodorou, M. K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330. doi:10.1016/S0377-8401(99)00033-4.

Menezes, D. R.; Costa, R. G.; Araújo, G. G. L.; et al. (2015). Cinética ruminal de dietas contendo farelo de mamona destoxificado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, n.2, p.636-641. doi:10.1590/1678-7040.

Mertens, D. R. (2002). Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, n.6, p.1217-1240. doi:10.1093/jaoac/85.6.1217.

Michalak, M.; Wojnarowski, K.; Cholewinska, P.; Szeligowska, N.; Bawej, M.; Pacoń, J. (2021). Selected alternative feed additives used to manipulate the rumen microbiome. **Animals**, v.11, n.6, p.1542. doi:10.3390/ani11061542.

Morgavi, D. P.; et al. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. **Animal**, v.4, n.7, p.1024-1036. doi:10.1017/S1751731110000547.

Murphy, J. J.; Kennelly, J. J. (1987). Effect of protein concentration and protein source on the degradability of dry matter and protein in situ. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.9, p.1841-1849. doi:10.3168/jds.S0022-0302(87)80215-0.

Njoku, P. C.; Akumefula, M. I. (2007). Phytochemical and nutrient evaluation of Spondias mombin leaves. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.6, n.6, p.613-615. doi:10.3923/pjn.2007.613.615.

Nocek, J. E.; Russell, J. B. (1988). Protein and energy as an integrated system: Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.8, p.2070-2107. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9.

Nørskov, N. P.; Battelli, M.; Curtasu, M. V.; Olijhoek, D. W.; Chassé, É.; Nielsen, M. O. (2023). Methane reduction by quercetin, tannic and salicylic acids: Influence of molecular structures on methane formation and fermentation in vitro. **Scientific Reports**, 13, 43041. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43041-w>

Nowak, B.; Moniuszko-Szajwaj, B.; Skorupka, M.; Puchalska, J.; Kozłowska, M.; Bocianowski, J.; Kołodziejewski, P. A.; Szumacher-Strabel, M.; Patra, A. K.; Stochmal, A.; et al. (2022). Effect of Paulownia leaves extract levels on in vitro ruminal fermentation, microbial population, methane production, and fatty acid biohydrogenation. **Molecules**, v.27, n.13, p.4288. doi:10.3390/molecules27134288.

Nussio, L. G.; Campos, F. P.; Lima, M. L. M. (2006). Metabolismo de carboidratos estruturais. In: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. (Eds.). **Nutrição de ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: FUNEP, p.183-228.

Oba, M.; Allen, M. S. (1999). Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: Effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.3, p.589-596. doi:10.3168/JDS.S0022-0302(99)75271-9.

Oliveira, J. S. de; Zanine, A. D. M.; Santos, E. M. (2007). Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletrônica de Veterinária**, v.8, n.6, p.1-12.

Ørskov, E. R.; McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, n.2, p.499-503. doi:10.1017/S0021859600063048.

Raaman, N. (2006). Phytochemical techniques. New Delhi: **New India Publishing Agency**.

Santos, A. L. F.; Signor, M. H.; Giraldi, G. C.; Zago, I.; Lago, R. V. P.; Santin Junior, I. A.; Rosa, V. D.; Scussiato, A.; Marcondes, M. I.; Magro, J. D.; et al. (2025). Comparative evaluation of ionophores on the in vitro fermentation dynamics of wheat silage using a gas production system. **Fermentation**, v.11, n.11, p.630. doi:10.3390/fermentation11110630.

Satter, L. D.; Slyter, L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, v.32, n.2, p.199-208. doi:10.1079/BJN19740073.

Schofield, P.; Pitt, R. E.; Pell, A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991. doi:10.2527/1994.72112980x.

Silva, J. F. C.; Leão, M. I. (1979). **Fundamentos da nutrição de ruminantes**. Piracicaba: Livrocere. 380 p.

Sniffen, C. J.; O'Connor, J. D.; Van Soest, P. J.; et al. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3562-3577. doi:10.2527/1992.70113562x.

Suriyapha, C.; Cherdthong, A.; Suntara, C.; Polyorach, S. (2021). Utilization of yeast waste fermented citric waste as a protein source to replace soybean meal and various roughage to concentrate ratios on in vitro rumen fermentation, gas kinetic, and feed digestion. **Fermentation**, v.7, n.3, p.120. doi:10.3390/fermentation7030120.

Souza, F. X. de; Mendes, N. V. B. (2026). Aspectos gerais das principais Spondias cultivadas no Nordeste do Brasil. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. (Documentos, 205).

Suriyapha, C.; Phupaboon, S.; Dagaew, G.; et al. (2024). In vitro fermentation end-products and rumen microbiome as influenced by microencapsulated phytonutrient pellets (LEDRAON) supplementation. **Scientific Reports**, v.14, p.14425. doi:10.1038/s41598-024-59697-x.

Patra, A. K.; Saxena, J. (2009). Dietary phytochemicals as rumen modifiers: A review of the effects on microbial populations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, n.4, p.363-375. doi:10.1007/s10482-009-9364-1.

Preston, T. R. (1986). Better utilization of crop residues and by-products in animal feeding: Research guidelines. A practical manual for research workers. **FAO Animal Production and Health Paper**, v.50, p.345-364.

Tedeschi, L. O.; Muir, J. P.; Naumann, H. D.; Norris, A. B.; Ramírez-Restrepo, C. A.; Mertens-Talcott, S. U. (2021). Nutritional aspects of ecologically relevant phytochemicals in ruminant production. **Frontiers in Veterinary Science**, v.8, p.628445. doi:10.3389/fvets.2021.628445.

Theodorou, M. K.; Williams, B. A.; Dhanoa, M. S.; McAllan, A. B.; France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.3-4, p.185-197. doi:10.1016/0377-8401(94)90171-6.

Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.

Vieira, P. F. (1980). Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminantes. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Wanapat, M.; Gunun, P.; Anantasook, N.; Kang, S. (2014). Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. **Journal of Agricultural Science**, v.152, n.4, p.675-685. doi:10.1017/S0021859613000658.

Wischer, G.; Müller, K.; Hoffmann, M.; Schmid, E. (2013). Effect of monensin on in vitro fermentation of silages and microbial protein synthesis. **Archives of Animal Nutrition**, v.67, n.3, p.219-234. doi:10.1080/1745039X.2013.801141.

Yeoman, C. J.; Fields, C. J.; Lepercq, P.; Ruiz, P.; Forano, E.; White, B. A.; Mosoni, P. (2021). *In vivo* competitions between *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* in a gnotobiotic sheep model revealed by multi-omic analyses. **mBio**, v.12, n.2, e03533-20. doi:10.1128/mBio.03533-20.

V - CONCLUSÃO GERAL

O extrato etanólico das folhas de EESP apresenta potencial para modular a fermentação ruminal *in vitro*, promovendo alterações nos parâmetros fermentativos e na degradabilidade dos nutrientes. Os resultados demonstram que a inclusão do extrato influencia a dinâmica fermentativa ruminal, favorecendo a degradabilidade da matéria seca e da fração fibrosa, reduzindo a fração indigestível e promovendo respostas comparáveis ou superiores às observadas para a monensina em variáveis relacionadas à fermentação ruminal.

Embora algumas variáveis tenham apresentado resposta aos níveis de inclusão do extrato, os benefícios observados não foram acompanhados por ganhos proporcionais com o aumento das doses avaliadas. Nesse contexto, a inclusão de 8% do EESP destaca-se por apresentar desempenho semelhante ao observado nos níveis superiores para os principais parâmetros fermentativos e de degradabilidade, representando uma alternativa promissora para utilização do extrato nas condições experimentais do estudo.

Os resultados obtidos sustentam a hipótese de que o EESP é capaz de modular a fermentação ruminal e evidenciam o potencial de utilização de compostos bioativos provenientes das folhas de *Spondias purpurea* L. como aditivos fitogênicos para ruminantes. Entretanto, a caracterização fitoquímica detalhada do extrato, a elucidação de seus mecanismos de ação sobre a microbiota ruminal, a avaliação de seus efeitos sobre a produção de metano e a validação de sua aplicabilidade em condições *in vivo* constituem etapas necessárias para consolidar seu potencial de utilização como aditivo alimentar.