











## Triagem *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *Spondias purpurea* L. sobre a fermentação ruminal

[ *In vitro* screening of the ethanolic extract of *Spondias purpurea* L. leaves on ruminal fermentation ]

Eduardo Henrique Santos de Lima\*<sup>1</sup> , Márcio dos Santos Pedreira<sup>1</sup> , Gabriele Marisco da Silva<sup>2</sup> , Grazielle Goes Rios<sup>1</sup> , Vanessa Santos Souza Evangelista<sup>1</sup> , Juan Mark Silva Amorim<sup>1</sup> , Luiza Maria Gigante Nascimento<sup>1</sup> 

1 Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga, Bahia, Brasil 

2 Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista, Bahia, Brasil 

\*autor correspondente: ehslmvz@gmail.com

Recebido: 31 de agosto de 2025. Aceito: 08 de dezembro de 2025. Publicado: 26 de janeiro de 2026.  
Editor: Rondineli P. Barbero

**Resumo:** Estratégias nutricionais que otimizam o uso de recursos forrageiros têm recebido destaque, incluindo práticas que favorecem a degradabilidade ruminal e a atividade microbiana. Aditivos naturais ricos em fitoquímicos demonstram ser capazes de modular a microbiota e os processos fermentativos, configurando alternativas promissoras na nutrição de ruminantes. O estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do extrato etanólico das folhas de *Spondias purpurea* L. sobre a fermentação ruminal *in vitro*. A pesquisa utiliza delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos: controle, monensina e extrato vegetal. A cinética de produção de gás, a degradabilidade da matéria seca e os valores de pH são avaliados em diferentes tempos de incubação. O extrato apresenta alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e terpenos, sugerindo potencial modulador da microbiota ruminal. Os resultados evidenciam que o extrato aumenta a produção de gases e a degradabilidade da matéria seca. Observa redução no tempo de colonização microbiana e manutenção do pH dentro da faixa adequada para fermentação. Embora a taxa de crescimento da fermentação seja inferior à do controle, a produção acumulada de gás é maior com o extrato, indicando uma maior fermentação. A monensina, por sua vez, reduz a taxa de fermentação e o volume de gases. Conclui-se que o extrato de *Spondias purpurea* L. modula a fermentação ruminal *in vitro*, representando uma alternativa promissora. Recomenda-se avaliar diferentes concentrações e os seus efeitos sobre ácidos graxos de cadeia curta, produção de metano, nitrogênio amoniacal e degradabilidade da fibra e dos carboidratos não fibrosos, bem como a condução de experimentos *in vivo*.

**Palavras-chave:** aditivos naturais; metabolismo microbiano; modulação ruminal; ruminantes.

**Abstract:** Nutritional strategies that optimize the use of forage resources have received attention, including practices that favor ruminal degradability and microbial activity. Natural additives rich in phytochemicals have been shown to modulate the microbiota and fermentative processes, representing promising alternatives in ruminant nutrition. This study aimed to evaluate the effects of the ethanolic extract of *Spondias purpurea* L. leaves on *in vitro* ruminal fermentation. The research used a completely randomized design with three treatments: control, monensin, and plant extract.

Gas production kinetics, dry matter degradability, and pH values were evaluated at different incubation times. The extract contains alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, and terpenes, suggesting potential for modulating the ruminal microbiota. The results show that the extract increases gas production and dry matter degradability. A reduction in microbial colonization time and maintenance of pH within the appropriate range for fermentation were observed. Although the fermentation growth rate is lower than in the control, the cumulative gas production is higher with the extract, indicating greater fermentation. Monensin, in turn, reduces the fermentation rate and gas volume. It is concluded that the *Spondias purpurea* L. extract modulates ruminal fermentation *in vitro*, representing a promising alternative. It is recommended to evaluate different concentrations and their effects on short-chain fatty acids, methane production, ammoniacal nitrogen, and the degradability of fiber and non-fibrous carbohydrates, as well as conducting *in vivo* experiments.

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

---

## 1. Introdução

Os ruminantes desempenham um papel estratégico na segurança alimentar global e na sustentabilidade dos sistemas agropecuários, devido à sua capacidade de converter biomassa vegetal em proteína animal de alto valor biológico <sup>(1)</sup>. Além disso, são capazes de aproveitar recursos frequentemente considerados resíduos ou subprodutos agroindustriais, promovendo sua valorização na forma de alimentos como carne e leite <sup>(2)</sup>. Embora as forragens constituam a base da alimentação desses animais, muitos desses recursos apresentam limitações importantes, especialmente pela acentuada variação sazonal na composição nutricional e na produção de biomassa, fatores que comprometem o desempenho produtivo. Em períodos de menor qualidade nutricional, observa-se redução nos carboidratos solúveis, menor aporte de compostos nitrogenados e maior teor de lignina, características que dificultam a degradação e prejudicam a fermentação ruminal <sup>(3)</sup>.

Como consequência, dietas com esse perfil aumentam a produção de metano no rúmen, resultando em perdas significativas de energia metabolizável e de nutrientes que poderiam ser direcionados à produção animal <sup>(4)</sup>. Esse incremento na metanogênese está relacionado à maior liberação de hidrogênio durante a degradação da fração fibrosa, que é prontamente utilizado pelas arqueias metanogênicas. Além disso, esse tipo de fermentação favorece a formação de acetato em detrimento do propionato, reduzindo a capacidade de sequestro de hidrogênio e intensificando ainda mais a produção de metano <sup>(5)</sup>.

A utilização de aditivos como os antibióticos ionóforos mostrou-se eficiente na melhoria da eficiência energética, na redução da degradação de proteínas e na regulação do pH ruminal <sup>(6)</sup>. No entanto, o uso contínuo e indiscriminado desses compostos contribuiu para o surgimento de microrganismos resistentes, tornando-se uma preocupação de saúde pública <sup>(7)</sup>, o que levou à sua proibição como aditivos na União Europeia <sup>(8)</sup>. Considerando esse cenário, é fundamental adotar estratégias nutricionais que favoreçam o uso eficiente de recursos forrageiros amplamente disponíveis, mas com limitações nutricionais. Entre essas estratégias, destacam-se o manejo adequado do pastejo, que maximiza a oferta de forragem de melhor qualidade e reduz perdas por senescência <sup>(9)</sup>; a adoção de práticas que melhorem a digestibilidade ruminal, como o uso de forragens em estádios vegetativos mais precoces ou o ajuste da oferta de fibra fisicamente efetiva <sup>(10)</sup> e a suplementação proteico-energética, reconhecida por estimular o consumo, a atividade microbiana e a degradação da fibra <sup>(11)</sup>. Além da inclusão de ingredientes alternativos,

especialmente aditivos naturais, que constitui uma estratégia voltada à modulação da microbiota e dos processos fermentativos <sup>(12)</sup>. Plantas ricas em fitoquímicos e seus extratos têm se destacado como alternativas promissoras aos aditivos tradicionais, oferecendo uma abordagem mais sustentável e alinhada à nutrição de ruminantes <sup>(13)</sup>.

A *Spondias purpurea* L., conhecida popularmente como seriguela, é uma espécie originária da América Central e amplamente distribuída no Nordeste brasileiro. Tradicionalmente utilizada na medicina popular, apresenta propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antidiarreicas e gastroprotetoras <sup>(14)</sup>. Pesquisas conduzidas com outras espécies do gênero *Spondias* indicam que as respostas dos animais podem variar de acordo com a parte da planta utilizada e o nível de inclusão. A triagem fitoquímica qualitativa das folhas de *S. mombin* revelou a presença dos compostos bioativos taninos, flavonoides, saponinas, alcaloides e fenóis <sup>(15)</sup>.

O resíduo da polpa de *S. tuberosa* foi associado ao aumento da ingestão de fibra e do tempo de ruminação, embora tenha reduzido a digestibilidade da matéria seca <sup>(16)</sup>. Para inclusão de níveis iguais ou superiores a 50 % de *S. mombin* associada à farinha de mandioca elevou o consumo e o ganho de peso de ovinos, sem comprometer a digestibilidade <sup>(17)</sup>. No entanto, investigações envolvendo a *S. purpurea* L. e sua aplicação em ruminantes ainda são limitadas.

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito do extrato etanólico das folhas de *S. purpurea* L. na cinética de produção de gás, da degradabilidade da matéria seca e do pH ruminal em condições *in vitro* do ambiente ruminal.

## 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 (*S. 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 ( $\pm 40$  °C) e, em seguida maceradas com um pistilo, para posterior obtenção do extrato vegetal.

Para a preparação do extrato, uma amostra de 100 gramas das folhas foram exaustivamente extraídas com etanol (99,9 %), em ciclos de 72 horas cada. Após cada extração, o material filtrado em papel de filtro e concentrado em um evaporador rotativo sendo submetido a triagem química qualitativa para presença de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e terpenos, conforme metodologia descrita. 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 diluindo-se o extrato vegetal (1 ml) com água destilada

(20 ml) e agitando-se em uma proveta graduada por 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 <sup>(18,19)</sup>.

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. Para os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM) foram determinados de acordo com AOAC <sup>(20)</sup>. Para a determinação da fibra em detergente neutro (FDN) utilizou a metodologia empregada por Mertens et al. <sup>(21)</sup>. Os carboidratos totais (CT) foram estimados por meio da equação proposta por Sniffen et al. <sup>(22)</sup>,  $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$  e os carboidratos não-fibrosos (CNF) segundo Van Soest et al. <sup>(23)</sup>,  $CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM + \%FDN)$ .

**Tabela 1.** Composição química dos ingredientes e da ração experimental

Ingredientes	Composição química (g/kg MS)								
	MS <sup>1</sup>	MM <sup>2</sup>	PB <sup>3</sup>	EE <sup>4</sup>	FDN <sup>5</sup>	FDA <sup>6</sup>	HEM <sup>7</sup>	CT <sup>8</sup>	CNF <sup>9</sup>
Feno de tifton	895,4	66,7	59,4	14,2	848,1	498,2	349,9	859,7	11,6
Milho moído	875,6	9,2	77,1	38,1	157,5	25,4	132,1	875,6	718,2
Farelo de soja	885,8	65,3	487,0	9,6	225,9	49,7	176,2	438,2	212,3
Dieta experimental	883,5	38,2	161,8	31,2	333,6	137,4	196,3	768,8	435,1
Proporção dos ingredientes da dieta (g/kg MS)									
Dieta experimental	Feno de tifton			Milho moído			Farelo de soja		
	308,0			492,0			200,0		

<sup>1</sup>Matéria Seca, <sup>2</sup>Matéria Mineral, <sup>3</sup>Proteína Bruta, <sup>4</sup>Extrato Etéreo, <sup>5</sup>Fibra em Detergente Neutro, <sup>6</sup>Fibra em Detergente Ácido, <sup>7</sup>Hemicelulose, <sup>8</sup>Carboidratos Totais, <sup>9</sup>Carboidratos Não Fibrosos.

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 gazes, 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 CO<sub>2</sub>, para manter as condições de anaerobiose.

O meio de incubação preparado conforme descrito por Theodorou et al. <sup>(24)</sup>. 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 CO<sub>2</sub> gasoso para atingir pH entre 6,8 – 6,9 e obter coloração rósea.

Os ingredientes da ração testada foram moídos (granulometria = 1 mm) e pesados separadamente em sacos de náilon (5 x 10 cm), com tamanho de poro de 50 µm (1 g de ração/saco), que foram colocados em frascos de vidro de 160 ml. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três tratamentos, consistindo no extrato etanólico de *S. purpurea* L., a monensina sódica, com inclusão de 5 µM<sup>(25)</sup> e o controle, sem aditivo. Como o extrato é altamente viscoso, foi diluído utilizando dimetilsulfóxido (DMSO). Em cada frasco, foram adicionados 87 ml do meio de incubação, 3 ml de DMSO puro para o tratamento controle e da monensina, e 3 ml do extrato etanólico de *S. purpurea* L., diluído a uma concentração de 8 % em DMSO, totalizando o volume final de 90 ml para cada 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 CO<sub>2</sub>, 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.<sup>(26)</sup> e modificada por Menezes et al.<sup>(27)</sup>. A pressão 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; 48 e 72 horas.

Os dados de pressão obtidos foram transformados em volume de gases, conforme a equação proposta por Figueiredo et al.<sup>(28)</sup>, 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).

A cinética da produção cumulativa de gases avaliada pelo modelo de Gompertz:  $Y = A \cdot \exp(-B \cdot \exp(-k \cdot \text{tempo}))$ ,

Onde: Y= produção de gás cumulativa (ml/g); A= produção máxima de gás (ml); B= lagtime antes que a produção exponencial começar (h); K= taxa de produção específica de gás (ml/h) no tempo (h)<sup>(29)</sup>.

Ao final de cada período pré-determinado da fermentação (2, 6, 12, 24, 48 e 72 horas), os frascos foram removidos da estufa, sendo em seguida realizada a leitura do pH do meio. A degradabilidade aparente da matéria seca das rações foi determinada pela remoção dos sacos de náilon<sup>(27)</sup> às 2, 6, 12, 24, 48 e 72 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. A degradabilidade foi calculada pela diferença de pesagem do saco com amostra antes e após a incubação.

Os parâmetros do modelo foram estimados software estatístico SAS <sup>(30)</sup>, através do procedimento NLIN. Os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo procedimento do modelo linear geral (PROC GLM) do SAS. As médias dos tratamentos comparadas aplicando-se o teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

### 3. Resultados e discussão

O extrato bruto das folhas de seriguela (*S purpurea* L.) apresentou alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e terpenos, conforme identificado no presente estudo. Resultados semelhantes foram descritos por Marisco et al. <sup>(31)</sup>, os quais avaliaram diferentes solventes para a extração de compostos bioativos das folhas de *S purpurea* L., os autores observaram que o extrato etanólico apresentou maior diversidade fitoquímica em comparação aos extratos obtidos com clorofórmio, clorofórmio-metanol e acetato de etila, nos quais determinados compostos estavam ausentes.

A presença de compostos bioativos semelhantes em extratos de outras plantas reforça a importância dos métodos de extração na composição química final. Oliveira et al. <sup>(32)</sup>, ao analisarem o extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera*, identificaram saponinas, flavonoides, taninos, alcaloides e fenóis totais. Da mesma forma, Baihaqi et al. <sup>(33)</sup> verificaram que o extrato aquoso das sementes de *Carica pubescens* reunia taninos, flavonoides, alcaloides, saponinas e esteroides, demonstrando a ampla distribuição dos referidos compostos em diferentes espécies vegetais.

A eficiência da extração de compostos bioativos pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a escolha do solvente, tamanho da partícula, temperatura, tempo e método de extração <sup>(34)</sup>. Esses fatores determinam não apenas a quantidade, mas também a diversidade dos fitoquímicos presentes nos extratos. Os compostos bioativos desempenham múltiplos papéis na defesa das plantas e apresentam diversas atividades biológicas que podem impactar os microrganismos <sup>(35)</sup>.

A complexidade química dos extratos vegetais, caracterizada pela presença dos compostos, ressalta seu potencial como fontes de moléculas bioativas <sup>(36)</sup>. Os compostos podem interagir com microrganismos do rúmen, alterando suas vias metabólicas e, influenciando a eficiência da utilização dos alimentos por animais ruminantes.

A Tabela 2 apresenta as estimativas dos parâmetros do modelo de Gompertz para a produção de gás *in vitro*, abrangendo o potencial máximo de produção de gases (A), o tempo de colonização (B) e a taxa de crescimento da produção de gás (K), após 72 horas de incubação.

**Tabela 2.** Estimativa dos parâmetros de produção de gás *in vitro* para os tratamentos Controle, Extrato e Monensina.

Parâmetros	Tratamentos			P-valor	EPM
	Controle	Extrato	Monensina		
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 - Potencial máximo de produção de gases, em ml/ g MS; B - Tempo de colonização lag time, em horas (h); K - Taxa de crescimento da produção de gás, em horas. Os valores na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P < 0,05). P-valor indica o nível de significância estatística, e EPM representa o erro padrão da média.



O potencial máximo de produção de gases (A) apresentou diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0,0001$ ), sendo o valor observado para o extrato (161,26 mL/g MS) superior a monensina (126,76 mL/g MS) e o controle (126,59 mL/g MS). O desempenho observado para o extrato pode estar relacionado à presença de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas e terpenos identificados no extrato bruto das folhas de *S purpurea* L.

A monensina manteve o potencial de produção de gás semelhante ao controle, indicando uma inibição da fermentação. Russell & Strobel <sup>(37)</sup> descreveram a capacidade da monensina em inibir bactérias gram-positivas produtoras de hidrogênio, reduzindo o acúmulo de gás sem comprometer a digestão. Os metabólitos encontrados nas plantas possuem a capacidade de modular seletivamente a microbiota ruminal favorecendo o processo fermentativo <sup>(38)</sup>. A utilização de extratos vegetais pode resultar tanto no aumento da produção total de gás, em função da melhoria da fermentação, quanto na redução dessa produção, especialmente de metano, através da modulação de microrganismos metanogênicos <sup>(39,40)</sup>.

No rúmen, os alcaloides têm demonstrado eficácia contra microrganismos específicos, esses compostos reduzem populações de protozoários e arqueias metanogênicas, impactando diretamente a fermentação ruminal. A redução na concentração de hidrogênio disponível para a metanogênese redireciona o fluxo metabólico para a produção de propionato, um ácido graxo volátil mais eficiente em termos energéticos, também reduzindo as emissões de metano <sup>(41)</sup>.

A ação dos flavonoides inclui danos à membrana citoplasmática, inibição da síntese de ácidos nucleicos e do metabolismo energético, além de interferências na parede celular <sup>(42,43)</sup>. Os compostos interagem com centros nucleofílicos no peptidoglicano, tornando as bactérias gram-positivas mais suscetíveis devido à maior proporção desse componente em suas paredes celulares <sup>(44)</sup>. Essa ação reduz as bactérias gram-positivas, ao mesmo tempo que favorece bactérias gram-negativas produtoras de propionato, promovendo mudanças benéficas na fermentação ruminal <sup>(45,46)</sup>.

Os taninos podem exercer efeito modulador sobre o ecossistema ruminal, reduzindo populações de protozoários e de arqueias metanogênicas, o que contribui para diminuir a produção de amônia, metano e a relação acetato:propionato <sup>(47)</sup>. A sua ação antimicrobiana pode ocorrer por diferentes mecanismos, incluindo a inibição de enzimas bacterianas e fúngicas, a formação de complexos com os substratos dessas enzimas e a interação com membranas celulares, que resulta em alterações metabólicas <sup>(48)</sup>.

A atividade sobre bactérias celulolíticas, reduz a degradação da fibra e a produção de acetato, diminuindo a oferta de hidrogênio necessária à metanogênese <sup>(49,50)</sup>. Esses compostos também apresentam afinidade por carboidratos estruturais devido aos grupos hidroxila fenólicos, formando complexos que tornam o substrato menos acessível à fermentação microbiana <sup>(51)</sup>. Além disso, a formação de complexos estáveis com proteínas no rúmen aumenta a quantidade de proteína que escapa da degradação ruminal e se torna disponível para digestão intestinal <sup>(52)</sup>.

As saponinas no rúmen podem formar complexos com os esteróis presentes nas membranas celulares dos protozoários, aumentando a permeabilidade, o que leva à ruptura e lise celular. Esse 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 <sup>(53)</sup>.

A redução no número de protozoários no rúmen promove um aumento na síntese de proteínas bacterianas e retarda a renovação da proteína ruminal, resultando em maior fluxo de nitrogênio bacteriano para o duodeno. Além disso, essa diminuição afeta a produção de metano, uma vez que muitas arqueias metanogênicas vivem em associação simbiótica com os protozoários. Essas arqueias utilizam o hidrogênio gerado pelos protozoários durante o metabolismo para realizar a metanogênese. Com a defaunação, ocorre uma redução na disponibilidade de hidrogênio, limitando a atividade das arqueias metanogênicas <sup>(54)</sup>.

Os óleos essenciais são compostos principalmente por derivados do isopreno, como monoterpenos e sesquiterpenos, ou compostos aromáticos de baixo peso molecular <sup>(55)</sup>. Os terpenoides incluem monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e, em menor quantidade, diterpenos (C20) <sup>(56,57)</sup>. Seus compostos ativos desestabilizam as membranas dos protozoários e das bactérias gram-positivas, de maneira similar aos ionóforos <sup>(58)</sup>. A natureza hidrofóbica dos hidrocarbonetos cíclicos nos terpenoides permite que eles se acumulem na bicamada lipídica das bactérias, desintegrando suas membranas e tornando-as mais permeáveis, o que resulta em translocação de íons e redução do gradiente iônico. Esse processo consome energia das bactérias, podendo levar à morte celular caso o metabolismo seja desviado para manter o equilíbrio iônico <sup>(59)</sup>.

O principal mecanismo de ação, envolve a inibição da aderência bacteriana às partículas alimentares, reduzindo a desaminação de aminoácidos e a produção de  $\text{N-NH}_3$  no rúmen. A redução do pH ruminal também modifica o perfil fermentativo, uma vez que ambientes mais ácidos inibem bactérias fibrolíticas e favorecem a predominância de amilolíticas, o que resulta em maior produção de propionato <sup>(60)</sup>.

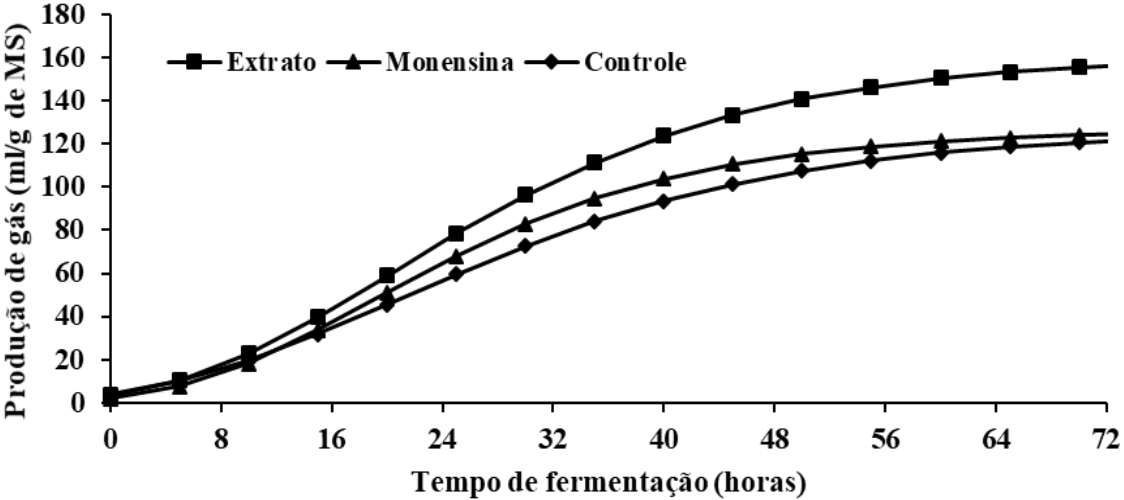
O tempo de colonização (B) também indicou diferença significativa ( $P = 0,0325$ ), com os tratamentos monensina (3,43 h) e extrato (3,81 h) reduzindo seu tempo em relação ao controle (4,12 h). A inclusão da monensina e do extrato reduziu em 16,74 % e 7,52 % o tempo, evidenciando que ambos os aditivos aceleraram o início da fermentação. Segundo Oliveira et al. <sup>(61)</sup>, o tempo de colonização é explicado pelo período entre a adesão microbiana à partícula alimentar e o início efetivo da degradação do substrato, constitui um parâmetro determinante para a taxa de crescimento microbiano, sendo assim, sua redução está diretamente associada ao aumento da eficiência desse processo. Assim, o tempo de colonização representa o período necessário para que os microrganismos consigam se fixar ao alimento e transpor suas barreiras estruturais, permitindo o acesso efetivo aos substratos fermentáveis <sup>(62)</sup>.

A taxa de crescimento (K), que representa a velocidade da fermentação após a fase inicial, diferiu significativamente entre os tratamentos ( $P < 0,0001$ ). O tratamento controle apresentou a maior taxa (0,076 h), seguido pelo extrato vegetal (0,067 h), enquanto a monensina resultou na menor taxa (0,061 h). Tais evidências indicam que, embora a monensina tenha promovido início mais precoce da fermentação (lag time = 3,43 h), sua ação modulou a velocidade de produção de gás, reduzindo a atividade fermentativa ao longo do tempo.

O controle, apesar de apresentar o maior tempo de colonização (4,12 h), exibiu fermentação mais intensa e rápida. O tempo maior de colonização pode refletir uma menor pressão seletiva sobre as populações dos microrganismos, permitindo o estabelecimento de comunidades mais diversas antes do pico fermentativo <sup>(63)</sup>. O extrato vegetal apresentou um padrão de resposta, com tempo de colonização reduzido (3,81 h) e taxa de crescimento intermediária, essa resposta pode indicar que compostos bioativos presentes, atuaram seletivamente sobre os microrganismos do rúmen.



A produção cumulativa de gases aumentou ao longo do tempo em todos os tratamentos (Figura 1), com o extrato apresentando os maiores volumes totais ao final das 72 horas de incubação. A maior produção de gás observada também pode estar associada a uma maior digestibilidade da matéria orgânica, uma vez que, há forte correlação entre o volume de gás gerado e a degradabilidade dos substratos incubados <sup>(64)</sup>.



**Figura 1.** Produção cumulativa de gases (ml) ao longo do tempo de fermentação (72 horas) para os tratamentos: Extrato, Monensina e Controle.

Em contraste, a monensina reduziu significativamente a produção de gases, indicando um maior controle da atividade microbiana, o que pode ter reduzido a produção total de gases ao longo do tempo, já o tratamento controle apresentou valores intermediários, refletindo a fermentação natural do substrato sem aditivos. A Tabela 3 mostra que nos tempos de incubação de 2 (P = 0,3115), 6 (P = 0,5091), 12 (P = 0,9470) e 48 horas (P = 0,4576), não houve diferença significativa entre os tratamentos. No tempo de 24 horas (P = 0,0239), o tratamento com extrato (452,75 g/kg MS) apresentou maior degradabilidade da matéria seca (MS) em comparação ao controle (415,41 g/kg MS) e à monensina (418,30 g/kg MS). No tempo de 72 horas (P = 0,0402), a degradabilidade do extrato (569,31 g/kg MS) não diferiu da monensina (563,83 g/kg MS), mas foi superior ao controle (528,39 g/kg MS).

**Tabela 3.** Degradabilidade aparente da matéria seca (g/ kg MS) ao longo do tempo de incubação para os tratamentos Controle, Extrato e Monensina.

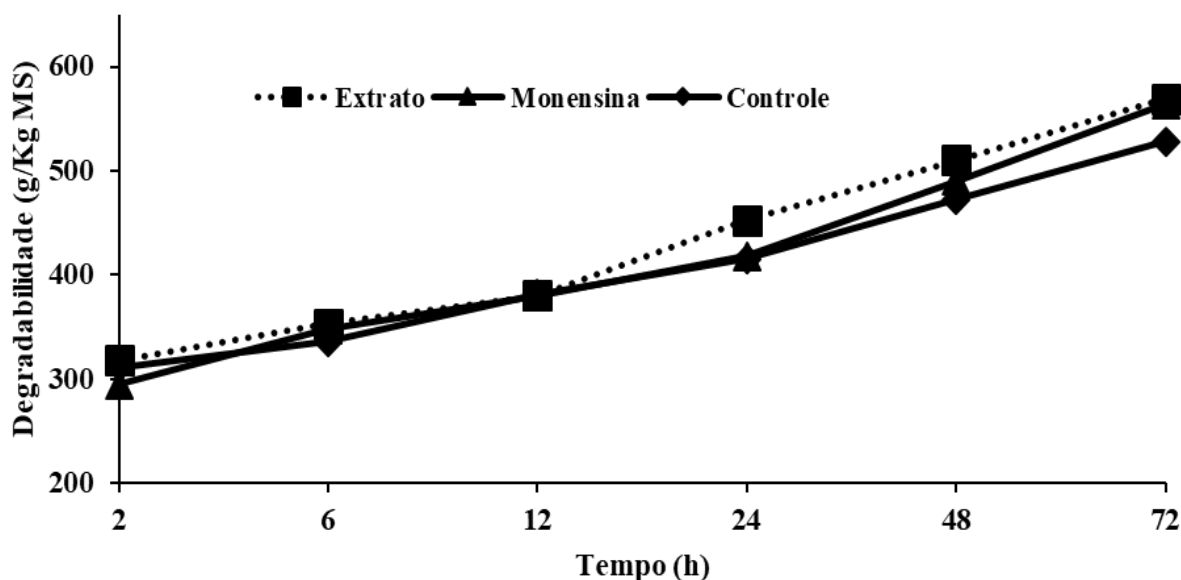
Tempo de incubação (horas)	Tratamentos			P-valor	EPM
	Degradabilidade <i>in vitro</i> da MS, %				
	Controle	Extrato	Monensina		
2	311,72	317,97	295,22	0.3115	5,11
6	336,14	353,59	348,19	0.5091	5,58
12	381,64	380,28	379,78	0.9470	2,36
24	415,41b	452,75a	418,30b	0.0239	2,94
48	477,64	490,03	490,23	0.4576	4,35
72	528,39b	569,31a	563,83ab	0.0402	3,81

Os valores na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey (P < 0,05). P-valor indica o nível de significância estatística, e EPM representa o erro padrão da média.

Os resultados indicam que o extrato influenciou significativamente a fermentação ruminal e a degradabilidade da MS, apresentando um efeito distinto em relação à monensina e ao controle. A maior produção de gás foi acompanhada por uma maior degradabilidade da MS, especialmente nos tempos de 24 e 72 horas (Figura 2). O comportamento observado sugere que sua ação se estendeu ao longo da fermentação. Alvarado-Ramírez et al. <sup>(65)</sup> relatam que o aumento na produção de gás pode estar associado à maior disponibilidade de substratos fermentáveis promovida por extratos vegetais.

A degradabilidade *in vitro* da matéria seca apresentou crescimento linear ao longo do tempo de incubação em todos os tratamentos avaliados. A ausência de diferenças na degradabilidade da MS entre os tratamentos nos tempos iniciais (2h, 6h e 12h) indica que os efeitos dos aditivos ocorrem de forma mais evidente de médio a longo prazo.

Dietas ou substratos com maior potencial fermentativo podem reduzir o tempo necessário para que a degradabilidade ocorra, uma vez que a disponibilidade de compostos prontamente degradáveis favorece a colonização inicial pelos microrganismos e acelera a taxa de degradação da matéria seca. Mertens <sup>(67)</sup> destaca que a fermentabilidade do alimento e a velocidade de colonização microbiana são determinantes diretos do ritmo ruminal. A maior produção inicial de ácidos graxos voláteis em dietas rapidamente fermentescíveis intensifica a degradação ruminal nas primeiras horas de incubação <sup>(68)</sup>. No entanto, embora o tempo possa ser reduzido em condições de alta fermentação, a degradabilidade total depende da estabilidade do pH ruminal, pois ambientes excessivamente ácidos prejudicam a atividade das bactérias fibrolíticas e podem limitar a degradação da fração fibrosa ao longo do tempo.



**Figura 2.** Degradabilidade da matéria seca (g/Kg MS) ao longo do tempo de fermentação (72 horas) para os tratamentos: Extrato, Monensina e Controle.

Abd'Quadri-Abojukoroum et al. <sup>(68)</sup> avaliaram extratos etanólicos de folhas ao longo de 48 horas de incubação, com o extrato de limão (*Citrus limon*) a maior produção de gás (140 mL/g MS) e degradabilidade (385 g/kg MS), não diferindo do controle (104 mL/g MS e 382 g/kg MS), porém a monensina reduziu a sua produção de gás (66 mL/g MS e 327 g/kg MS).

No presente estudo, os tratamentos não influenciaram o pH, porém, os tempos de incubação afetaram significativamente os valores médios, que variaram entre 6,59 e 7,06 (Tabela 4). A estabilidade do pH é fundamental para a manutenção da fermentação ruminal eficiente e da atividade microbiana. A ausência de efeito dos tratamentos, sugere que tanto o extrato vegetal quanto a monensina não comprometeram o equilíbrio do ambiente ruminal, aspecto positivo para a digestibilidade dos nutrientes.

**Tabela 4.** Valores de pH ruminal ao longo do tempo de incubação para os tratamentos Controle, Extrato e Monensina

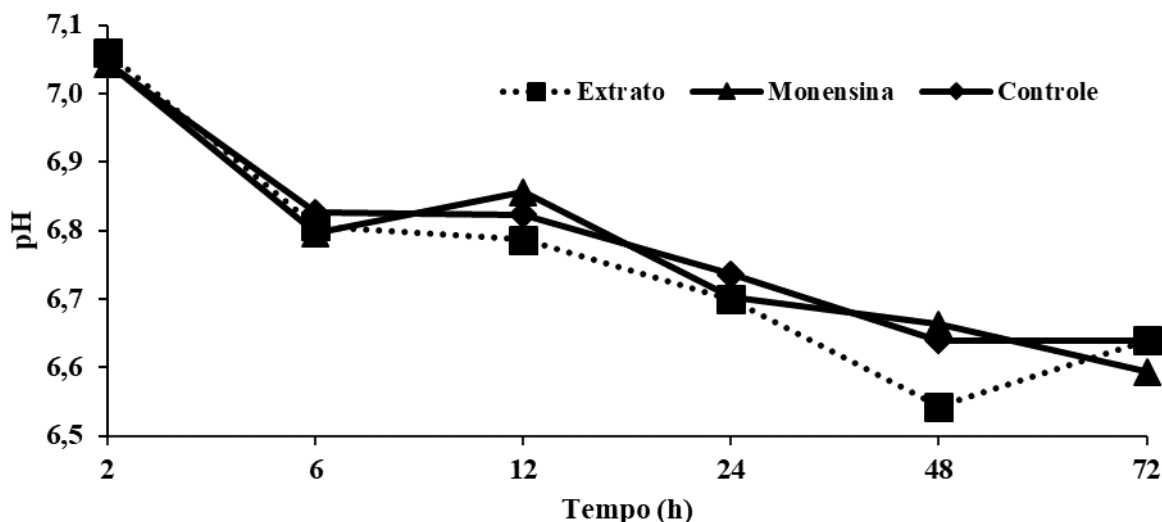
Tratamentos	Tempo de incubação (horas)						P-valor	EPM
	2	6	12	24	48	72		
	pH							
Controle	7,04aA	6,82abA	6,82abA	6,73bA	6,64bA	6,64bA	0.0019	0.0545
Extrato	7,06aA	6,80bA	6,78bcA	6,70bcA	6,54dA	6,64cdA	<.0001	0.0329
Monensina	7,04aA	6,79bcA	6,85bA	6,70cdA	6,66deA	6,59eA	<.0001	0.0229
	P-valor							
	0.9792	0.2282	0.2941	0.4190	0.3021	0.4019		

Os valores na mesma linha seguidos por letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença entre os tratamentos dentro de cada tempo de incubação pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). P-valor indica o nível de significância estatística, e EPM representa o erro padrão da média.

A redução progressiva do pH ao longo do tempo de incubação pode indicar intensificação da fermentação microbiana, resultando em maior produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) <sup>(69,70)</sup>. Baihaq et al. <sup>(33)</sup> encontraram uma variação do pH entre 6,81 e 6,86 em incubação *in vitro* com extrato aquoso de *Carica pubescens*, sem alterações significativas mesmo com concentrações de extrato de até 5 %. Abd'Quadri-Abojukoroum et al. <sup>(68)</sup> observaram que nos tempos de 16 e 48 horas de incubação com feno de *Themeda triandra* e 22 extratos etanólicos, o pH permaneceu na faixa normal de 6,0 a 7,0.

O teor de fibra detergente neutro (FDN) da dieta experimental do nosso estudo, pode ter desempenhado um papel na manutenção do pH ao longo do tempo. Hassan et al. <sup>(71)</sup> destacam que a fibra desempenha um papel crucial na modulação do ambiente ruminal e influenciando a estabilidade do pH ruminal. Em sistemas *in vivo*, a fibra fisicamente efetiva estimula a mastigação e a produção de saliva, promovendo o tamponamento do pH ruminal. No entanto, em sistemas *in vitro*, não há secreção salivar propriamente dita, o que existe é a utilização de uma solução tampão que busca reproduzir parcialmente a função tamponante da saliva. Dessa forma, a estabilidade do pH nesses sistemas depende diretamente da composição do tampão utilizado, bem como da taxa de fermentação dos substratos e da liberação gradual de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Ainda que o pH médio tenha diminuído em todos os tratamentos, observou-se uma tendência de redução mais acentuada no grupo suplementado com extrato, especialmente em tempos avançados de incubação. O resultado obtido confirma os dados de produção cumulativa de gás e degradabilidade da matéria seca, indicando maior fermentação nos tratamentos com extrato. Esse efeito pode explicar que apesar da redução mais acentuada do pH nos tratamentos com extrato neste estudo, os valores permaneceram dentro da faixa ideal para a fermentação ruminal (Figura 3).



**Figura 3** . Valores de pH ruminal ao longo do tempo de fermentação (72 horas) para os tratamentos: Extrato, Monensina e Controle.

Por sua vez, o tratamento com monensina apresentou menor variação de pH ao longo do tempo, possivelmente devido ao seu efeito modulador sobre a microbiota ruminal. Esse comportamento já foi descrito por Thomas <sup>(72)</sup>, que destacou a capacidade da monensina de reduzir a produção de ácidos orgânicos por populações microbianas específicas, estabilizando o ambiente ruminal. A monensina atua interrompendo o transporte de íons nas bactérias gram-positivas, reduzindo a produção de ácido lático e promovendo maior produção de propionato <sup>(73)</sup>.

Diferentemente da monensina, os extratos vegetais afetam o pH ruminal por mecanismos diversos. Estudos indicam que a adição de extratos pode elevar o pH ao reduzir as concentrações de ácido lático e AGCC, favorecendo um ambiente ruminal mais estável. No caso do extrato de canela, rico em fenóis, taninos e flavonoides, foi observado um aumento na proporção de acetato para propionato e maior produção de gases e AGCC, resultando em variações no pH ao longo da incubação <sup>(74)</sup>.

Dessa forma, os resultados sugerem que tanto a monensina quanto os extratos vegetais podem modular a fermentação ruminal sem comprometer a estabilidade do pH. Observa-se que os perfis fermentativos diferem entre os tratamentos, o que pode indicar mecanismos de ação distintos. Contudo, essas interpretações devem ser consideradas preliminares.

#### 4. Conclusão

O extrato etanólico de *S. purpurea* L. modula a fermentação ruminal *in vitro*, com aumento da produção de gases e da degradabilidade da matéria seca. Observa-se redução no tempo de colonização microbiana e manutenção do pH em níveis adequados. Os dados preliminares indicam o seu potencial como modulador da fermentação ruminal. Recomenda-se a quantificação dos compostos bioativos do extrato e níveis de inclusão, avaliando a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta, metano, nitrogênio amoniacal, degradabilidade da fibra e dos carboidratos não fibrosos, bem como a condução de experimentos *in vivo* para validação dos resultados.

### Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

### Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

### Contribuições do autor

Conceituação: Lima, E.H.S. Pedreira, M.S. Silva, G.M. Metodologia: Lima, E.H.S. Pedreira, M.S. Silva, G.M. Investigação: Lima, E.H.S. Rios, G.G. Amorim, J.M.S. Curadoria de dados: Lima, E.H.S. Amorim, J.M.S. Análise formal: Lima, E.H.S. Nascimento, L.M.G. Redação (esboço original): Lima, E.H.S. Aquisição de financiamento: Pedreira, M.S. Redação (revisão e edição): Pedreira, M.S. Silva, G.M. Nascimento, L.M.G. Recursos: Silva, G.M. Rios, G.G. Evangelista, V.S.S.

### Declaração de uso de IA generativa

Durante a preparação deste manuscrito, os autores utilizaram ResearchRabbit e SciSpace para auxílio na identificação e organização da literatura científica relevante. Após a utilização dessas ferramentas, os autores revisaram todo o conteúdo e assumem total responsabilidade pelo manuscrito.

### Referências

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. Disponível em: [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. Disponível em: <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. Disponível em: <https://doi.org/10.19080/JDVS.2019.09.555758>
4. Suriyapha C, Pongsub S, Sommai S, Wongtangtong E, Chuenwarin W, Phaikaew 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. Disponível em: <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. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00589>
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. Disponível em: <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. Disponível em: <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 (*S. 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 *S. 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 (*S. tuberosa* Arr. Cam) on intake, ingestive behaviour, digestibility, nitrogen balance and ruminal pH in sheep. *J Anim Feed Sci.* 2022;31(1):55–64. Disponível em: <https://doi.org/10.22358/jafs/146396/2022>
17. Eniolorunda OO, Awojobi HA, Ettu RO, Agunbiade JA, Oyekunle MA. Effect of *S. 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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. <https://doi.org/10.1590/1678-7040>
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*; 2003; Santa Maria, RS. *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 *S. purpurea* L. leaf extract against *Moniliophthora perniciosa* that causes witches broom disease of *Theobroma cacao*. *Int J Complement Altern Med.* 2017;7(1):00215. Disponível em: <https://doi.org/10.15406/ijcam.2017.07.00215>
32. Oliveira IST, Fernandes T, Santos ARD, González Aquino C, Vega Brites 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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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, Birsă 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. Disponível em: [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*. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
51. Patra AK, Saxena J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J Sci Food Agric*. PMID: 20815041.
52. Mueller-Harvey I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J Sci Food Agric*. 2006;86:2010-2037. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00399>
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. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14086>
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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.103>
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. <https://doi.org/10.4141/CJAS07012>
57. Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, et al. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Anim Sci*. 2007;90:2580-2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
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. Disponível em: [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. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712177>
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. <https://doi.org/10.5713/ajas.2002.1458>
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. Disponível em: <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). Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani13040764>
66. Mertens, DR. Rate and extent of digestion. *Journal of Dairy Science.* 1993;76(12):323-333. Disponível em: [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). Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <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. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03457-4>