



AVALIAÇÃO DA INCLUSÃO DE NÍVEIS DE TORTA DE NEEM SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*, CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE GÁS E EMISSÕES DE GASES DE EFEITO ESTUFA

Lílian de Castro **Pereira**¹; Bruna Roberta **Amâncio**²; Elaine **Magnani**³; Renata Helena **Branco**⁴;
Eduardo Marostegan de **Paula**⁵; Thiago Henrique da **Silva**⁶

Nº 24704

RESUMO – O objetivo do presente estudo foi avaliar doses crescentes de torta de Neem (*Azadirachta indica*), bem como uma dose única de monensina (controle positivo) sobre a fermentação ruminal *in vitro*, a cinética de produção de gases e as emissões de gases de efeito estufa entéricos em dietas de terminação para gado de confinamento. Quatro doses diferentes foram testadas independentemente, resultando em 6 tratamentos (controle negativo + 4 doses de torta de neem + controle positivo MON). A dieta basal consistiu em uma dieta típica de terminação para gado de corte (proporção de 15:85 de volumoso) e foi composta pelos seguintes tratamentos: controle negativo (CON; dieta basal sem aditivo); torta de neem nos níveis de 240, 480, 720 e 960 mg/kg de MS); e monensina como controle positivo a 30 mg/kg de MS. As dosagens foram calculadas proporcionalmente considerando um rúmen de 80 L de acordo com as recomendações do fabricante. Na dose mais alta (960 mg), a torta de neem apresentou produção de AGV semelhante à suplementação de monensina. Além disso, à medida que a torta de Neem aumentou, os ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR) aumentaram linearmente em comparação com a monensina. Além disso, a torta de neem foi eficaz em aumentar o pH do fluido ruminal em comparado à monensina e aumentou quadraticamente o N-amônia, mas não afetou as emissões de gases de efeito estufa.

Palavras-chaves: *Azadirachta indica*, gado de corte, dieta de terminação, metano, sustentabilidade.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Zootecnia, São José do Rio Preto-SP; pcastrolilian@gmail.com

2 Colaborador, Bolsista de Pós Doutorado: Centro de Pecuária Sustentável, Instituto de Zootecnia, São José do Rio Preto-SP;

3 Colaborador, Assistente de Pesquisa: Centro de Pecuária Sustentável, Instituto de Zootecnia, São José do Rio Preto-SP;

4 Colaborador, Pesquisador: Centro de Pecuária Sustentável, Instituto de Zootecnia, São José do Rio Preto-SP;

5 Colaborador, Jovem Pesquisador: Centro de Pecuária Sustentável, Instituto de Zootecnia, São José do Rio Preto-SP;

6 Orientador, Bolsista Pós-Doutorado FAPESP: Centro de Pecuária Sustentável, Instituto de Zootecnia, São José do Rio Preto-SP



ABSTRACT – The objective of the present study was to evaluate increasing doses of Neem cake (*Azadirachta indica*) as well as a unique monensin (positive control) dose on *in vitro* ruminal fermentation, gas production kinetic, and enteric greenhouse gas emissions in finishing diets for feedlot cattle. Four different doses were tested independently, resulting in 6 treatments (negative control + 4 doses of neem cake + positive control monensin). The basal diet consisted of a typical finishing beef cattle's diet (15:85 roughage: concentrate ratio) and was composed by the following treatments: negative control (CON; basal diet with no additive); Neem cake at levels of 240, 480, 720, and 960 mg/kg DM; and monensin (MON) as positive control at 30 mg/kg DM. The dosages were calculated proportionally considering a rumen of 80 L according to manufacturing recommendations. At highest dose (960 mg) neem cake had similar VFA production to monensin supplementation. In addition, as neem cake increased branch-chain fatty acids (BCVFA) increased linearly compared to monensin. Further, Neem cake was effective in increasing pH of ruminal fluid compared to monensin and quadratically increased ammonia-N but did not affect greenhouse gas emissions.

Keywords: *Azadirachta indica*, beef cattle, finishing diet, methane, sustainability.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária atualmente tem contado com aditivos em dietas que são capazes de reduzir a emissão de gases de efeito estufa, além de agregar na composição nutricional. Um exemplo é a planta *Azadirachta indica*, conhecida como Neem, pertence à família Meliaceae (mogno) e é proveniente da Ásia. O Neem é conhecido há muito tempo por suas propriedades medicinais herbáceas, como por exemplo seu efeito inseticida que pode atuar com mais de 430 espécies de pragas que ocorrem em vários países (MARTINEZ, 2002). Alguns estudos relataram baixa palatabilidade e efeitos adversos quando usada a torta de neem cru (torta de Neem com caroço). No entanto, a decortificação industrial tem sido eficaz para a máxima extração do óleo e remoção dos compostos tóxicos (NATH; RAJAGOPAL; GARG, 1983; ARUWAYO, 2013). Além de fornecer compostos bioativos, após a extração do óleo e caroço, a torta é uma boa fonte de nutrientes (GOWDA; SASTRY, 2000; ARUWAYO, 2013).

A planta de neem possui vários compostos bioativos, como alcaloides, carotenoides, flavonoides, cetonas, compostos fenólicos, esteroides e triterpenos (GUPTA et al., 2019). Além disso, a azadiractina, o meliantról, a salanina e a vilasina são metabólitos secundários bioativos específicos encontrados no neem. A azadiractina, um limonoide complexo tetranortriterpenoide, é particularmente abundante nos frutos de neem e é responsável por seus efeitos tóxicos sobre insetos (SARKAR; SINGH; BHATTACHARYA, 2021). Suas sementes, casca e folhas de neem possuem várias propriedades benéficas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos, anti-helmínticos, antioxidantes e imunoestimulantes (EL-HAWARY et al., 2013).



Como mencionado, *A. indica* é uma planta versátil que tem sido usada em ruminantes pelos seus efeitos na fermentação microbiana no rúmen, na saúde e desempenho dos animais e nas emissões de metano entérico (AKANMU; HASSEN, 2018; AKANMU; HASSEN; ADEJORO, 2020; EL-ZAIAT et al., 2022; WYLIE; MERRELL, 2022). DIDA; CHALLI; GANGASAHAY (2019) e JACK et al. (2020) relataram ganho médio diário (GMD), peso corporal final (PCF) e retorno líquido positivo favoráveis quando os animais foram suplementados com a torta de Neem após processamento com água. YANG; LAURAIN; AMETAJ (2009) investigaram os efeitos da adição de torta de Neem (20 e 40 g/kg MS) em dietas de bovinos terminados em confinamento. Os autores relataram maior eficiência de nitrogênio bacteriano e N bacteriano sintetizado em dietas suplementadas com Neem em comparação ao controle. No entanto, observaram uma redução linear na digestibilidade da MO e PB. AKANMU; HASSEN; ADEJORO (2020) avaliaram os efeitos de compostos naturais na digestibilidade *in vitro* e na produção de CH₄ e relataram que o uso de 50 mg/kg de extrato de *A. indica* reduziu a produção de CH₄ e melhorou a digestibilidade de uma dieta à base de forragem. Além disso, PATRA; KAMRA; AGARWAL (2006), em um estudo *in vitro*, relataram que a adição de extratos aquosos de sementes de Neem reduziu a síntese total de AGV no rúmen e afetou a atividade de protozoários.

Em conjunto, os resultados mostram que a torta de Neem pode modular a fermentação ruminal, melhorando a eficiência alimentar das dietas de ruminantes. No entanto, até onde sabemos, poucos estudos demonstraram o efeito do aumento nos níveis de suplementação com torta de Neem na fermentação ruminal *in vitro*, na cinética de produção de gás e nas emissões de gases de efeito estufa entéricos. O objetivo do presente estudo foi avaliar doses crescentes de torta de Neem, bem como uma dose única de monensina (controle positivo), sobre fermentação ruminal *in vitro*, cinética de produção de gás e emissões de gases de efeito estufa entéricos em dietas de terminação para bovinos de confinamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização experimental e aprovação ética

O experimento foi realizado no Instituto de Zootecnia, Centro de Pesquisa em Bovinos de Corte, localizado em Sertãozinho, São Paulo, Brasil. O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia.

2.2. Desenhos experimentais e análise química

Um experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar doses crescentes de torta de Neem (*Azadirachta indica*) em comparação com a suplementação de monensina (controle positivo). Quatro doses diferentes foram testadas independentemente, resultando em 6 tratamentos (controle negativo

+ 4 doses de torta de Neem + controle positivo MON). A dieta basal consistiu em uma dieta típica para bovinos de corte em fase de terminação (relação volumoso:concentrado de 15:85) e foi composta pelos seguintes tratamentos: controle negativo (CON; dieta basal sem aditivo); torta de Neem em níveis de 240, 480, 720 e 960 mg/kg de MS; e monensina (MON) como controle positivo a 30 mg/kg de MS. As dosagens foram calculadas proporcionalmente considerando um rúmen de 80 L de acordo com as recomendações do fabricante. A dieta foi formulada para atender aos requisitos nutricionais de um novilho não castrado com ganho médio diário de 1,8 kg/dia (NRC, 2016). Para todos os experimentos, foi utilizado um sistema automatizado de produção de gás *in vitro* com 43 frascos (Ankom Technology, Macedon, NY, EUA), equipado com sensores de pressão sem fio conectados a um computador, para avaliar o padrão de fermentação ruminal das dietas testadas. Assim, os tratamentos foram avaliados em quatro incubações de fermentação de 48 horas para analisar os perfis de produção de gás *in vitro* e os parâmetros de fermentação ruminal. Em cada incubação, os tratamentos foram incubados individualmente em frascos de 250 mL, que foram dispostos aleatoriamente na incubadora. Portanto, cada lote de fermentação teve 3 repetições de cada tratamento, mais 3 brancos (apenas solução de rúmen/mineral/tampão), totalizando 99 observações. Todos os ingredientes foram moídos por uma peneira de 1 mm usando um moinho Wiley (TE 650; Tecnal® Piracicaba, SP, Brasil) para realizar todas as incubações e análises. As amostras foram analisadas quanto à matéria seca (MS; método 930.15; AOAC, 1990), cinzas (método 942.05; AOAC, 1990), proteína bruta (Dumatherm®; Gerhardt GmbH & Co, Königswinter, Alemanha; método 990.13; AOAC, 2005) e extrato etéreo (EE; método 2003.05; AOAC, 1990). A matéria orgânica (MO) foi calculada como a diferença entre os teores de MS e cinzas. Para fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com alfa-amilase termoestável sem sulfato de sódio (VAN SOEST; MASON, 1991) e adaptadas para um Analisador de Fibras (TE 149; Tecnal®, Piracicaba, SP, Brasil).

2.3 Coleta de fluido ruminal e preparação de soluções tampão

O fluido ruminal foi coletado de três novilhos Nelore canulados no rúmen (peso corporal médio de 640 kg). Os novilhos foram mantidos com uma dieta total de 60% de silagem de milho e 40% de concentrado (grão de milho moído, pellet de polpa cítrica, farelo de soja e mistura mineral). Duas horas após a alimentação, 2000 mL de fluido ruminal foram coletados de cada animal, imediatamente filtrados através de 4 camadas de gaze, colocados em garrafas térmicas pré-aquecidas (39 °C) e transportados imediatamente para o laboratório (YÁÑEZ-RUIZ et al., 2016). As soluções tampão mineral de todos os experimentos foram preparadas de acordo com MENKE; STEINGASS (1988). A solução tampão foi mantida em um banho-maria a 39 °C e purgada continuamente com nitrogênio (N₂) por 30 minutos. Resazurina foi usada como indicador de cor para controlar o pH e a saturação de N₂ da solução tampão (potencial de oxidação-redução). O fluido ruminal foi misturado com a solução tampão (1:2 v/v) em banho-maria a 39 °C sob condições anaeróbicas, utilizando N₂.

2.4 Produção de gás *in vitro*

O sistema de válvulas das garrafas do sistema AnkomRF foi ajustado para serem ventiladas. Cada garrafa (250 mL) foi preenchida com 0,5 g de cada dieta. As amostras foram hidratadas com água deionizada para evitar a dispersão de partículas. As garrafas foram inoculadas com 75 mL de solução de rúmen/tampão, mantendo o espaço livre da garrafa continuamente purgado com N₂. Após a inoculação, as garrafas foram fechadas e colocadas no agitador incubador ventilado (EI-450T, ENGCO, Piracicaba, SP, BR) sob temperatura controlada (39 °C) e agitação (83 rpm). O software de aquisição de dados (Gas Pressure Monitor, Ankom technology, NY, EUA) foi configurado para monitorar a pressão cumulativa a cada 5 minutos, e os dados foram registrados a cada 60 minutos por 48 h em ambos os experimentos. As válvulas foram programadas para liberar automaticamente o gás quando as pressões atingiam 3,4 kPa (TAGLIAPIETRA et al., 2010). As pressões cumulativas de gás - produção de gás total (PG) - em 24 e 48 horas foram convertidas em mL de acordo com TAGLIAPIETRA et al. (2011) da seguinte forma: $PG, mL = (P_c / 6 P_o) \times V_o$, onde P_c é a alteração de pressão cumulativa (kPa) no espaço livre da garrafa; V_o é o volume do espaço livre da garrafa (95 mL), P_o é a pressão atmosférica lida pelo equipamento no início da medição. Os volumes finais de PG das garrafas foram corrigidos pela contribuição do inóculo, subtraindo o PG final das garrafas em branco. Para PG total ao longo do tempo, os valores de pressão cumulativa foram ajustados para avaliar os valores biológicos usando o seguinte modelo de duplo-pool (SCHOFIELD; PITT; PELL, 1994): $V_t = [V_1 / (1 + e^2 + 4 \times [K_1 \times (L - \text{Tempo})])] + [V_2 / (1 + e^2 + 4 \times [K_2 \times (L - \text{Tempo})])]$, onde: V_t = volume de gás produzido até o tempo específico, mL; V_1 e V_2 = volumes máximos de gás alcançados a partir da digestão completa de cada pool, mL; K_1 e K_2 = taxa específica de digestão de cada pool, h⁻¹; L = tempo de “lag”, h. O EM foi calculado de acordo com MENKE; STEINGASS (1988), com o teor de lipídios ignorado (GRINGS; BLÜMMEL; SÜDEKUM, 2005), da seguinte forma: $EM (MJ/kg MS) = 2,20 + (0,1357 \times PG_{200}) + (0,0057 \times PB)$, onde PG_{200} (mL/200 mg de MS incubada) é o PG medido em 48h. O pH da solução foi medido (Accumet™ AP61, Fisher Scientific, Atlanta, GA) no início e no final de cada incubação (48 h). A digestibilidade da *in vitro* da MO (DIVMO) foi calculada de acordo com MENKE; STEINGASS (1988), da seguinte forma: $DIVMO (g/kg MS) = 31,55 + 0,8343 \times PG_{200}$, onde PG é a produção líquida de gás (mL/200 mg MS) em 24 e 48h. Para a análise de nitrogênio amoniacal (NH₃-N) e AGV, subamostras de 15 mL da solução de rúmen/tampão antes da incubação e de cada garrafa em 48 h foram filtradas através de quatro camadas de gaze. Em seguida, 0,2 mL de uma solução de H₂SO₄ 500 mL/L foi adicionada para a determinação de NH₃-N e AGV. As concentrações de AGV foram determinadas por cromatografia gasosa (Nexis GC-2030; Shimadzu, Japão) equipada com uma capilar de vidro (Supelco Nukol™; 30000 cm x 0,53 mm i.d.) e acoplada a um detector de ionização de chama (FID), com N₂ utilizado como gás de arraste. A concentração de NH₃-N foi determinada por colorimetria (CHANEY; MARBACH, 1962). As concentrações totais de AGV e NH₃-N foram calculadas subtraindo os valores medidos no conteúdo

inicial dos componentes na solução de rúmen/tampão das concentrações finais de cada garrafa (TAGLIAPIETRA et al., 2013).

2.5 Dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) entéricos

Aqui, as válvulas das garrafas do sistema AnkomRF foram ajustadas para ficarem fechadas. Todos os outros procedimentos e designs foram os mesmos que no ensaio de PG total. Após a inoculação, as garrafas foram seladas e então colocadas em um agitador incubador ventilado (39 °C). No final de cada lote de fermentação (48h), a produção de CO₂ e CH₄ foi medida no espaço livre usando um cromatógrafo gasoso (Nexis GC-2030, Shimadzu) equipado com uma capilar GS-Carbonplot (Agilent Technologies, Inc.; 30000 cm x 0,32 mm i.d.) acoplada a um detector de ionização por descarga (BID), e hélio (999,9 mL/L) foi usado como gás de arraste. As produções entéricas de CH₄ e CO₂ das garrafas foram corrigidas pela contribuição do inóculo, subtraindo o PG final das garrafas em branco. O pH da solução foi medido (Accumet™ AP61, Fisher Scientific, Atlanta, GA) no início e no final de cada incubação (48 h).

2.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no SAS versão 9.4 (SAS Institute Inc.). Todos os resultados foram avaliados quanto à normalidade residual e homogeneidade de variância. Para todos os experimentos, os dados foram coletados e analisados em um delineamento completamente casualizado, ajustando os dados usando um modelo linear misto generalizado (procedimento GLIMMIX) e considerando a inclusão de torta de Neem como fator fixo e lote de fermentação como fator aleatório. Os lotes de fermentação foram considerados como unidades experimentais. O modelo não linear (procedimento NLIN) foi usado para estimar a taxa de fermentação e o tamanho do pool de gás. Os parâmetros das funções não lineares, bem como todas as outras variáveis, foram ajustados por meio de modelos mistos generalizados (procedimento GLIMMIX) e comparados usando o teste de Dunnett e regressões lineares polinomiais. Os níveis de adição foram analisados para respostas lineares e quadráticas usando o seguinte modelo: $Y_{ij} = B_0 + B_1X_i + B_2X_i^2 + P_j + e_{ij}$, onde Y_{ijk} é a medida observada do i-ésimo nível de aditivo na dieta do j-ésimo período de incubação; $i = 1, 2, 3, 4$ e 5 (níveis de inclusão de aditivo), B_0, B_1, B_2 = parâmetros de regressão do modelo; X_i = efeito do i-ésimo nível do fator quantitativo fixo (inclusão de torta de neem); P_j = efeito aleatório do lote de fermentação assumindo $P_j \sim N(0, P_j^2)$; e_{ij} = erro residual, assumindo $e_{ij} \sim N(0, \sigma e^2)$. Para todas as análises, diferenças detectadas em $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas, e diferenças em $0,05 < P < 0,10$ foram consideradas como tendência para significância estatística.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparado à monensina, a inclusão de torta de Neem, exceto na dose de 720 mg/kg de MS, reduziu a taxa de digestão do primeiro (rápido) pool de digestão. Esse efeito pode ter refletido nos valores de pH médio, que foram mais altos para a suplementação de torta de Neem em comparação com o tratamento com monensina. Esse efeito pode ser interessante considerando a inclusão de torta de Neem como um aditivo para prevenir a acidose ruminal em dietas ricas em grãos. No entanto, neste estudo, não avaliamos a produção de lactato para confirmar tal informação.

Na dose de 480 mg/kg de MS, a torta de Neem foi capaz de reduzir o valor do tempo de “lag”, o que pode melhorar a fermentabilidade da dieta. Antes do início da digestão, as bactérias precisam aderir às paredes celulares derivadas da dieta; no entanto, esse processo de adesão pode enfrentar limitações, pois tanto as partículas de alimentação quanto as bactérias apresentam carga negativa, reduzindo assim a taxa de degradação (OWENS; BASALAN, 2016). No entanto, embora tenha sido detectado um tempo de “lag” reduzido para a inclusão de torta de Neem na dose de 480 mg/kg de MS, não foram observados efeitos na produção de gás e IVOMD. Esses achados indicam que todos os componentes da torta de Neem já mencionados podem modular a população microbiana do rúmen; no entanto, nossos resultados não demonstraram melhor fermentabilidade ruminal com aumento do gasto energético de um substrato de dieta rica em grãos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Efeito da inclusão de torta de Neem e monensina (MON) sobre as variáveis^a de cinética em um sistema de produção de gás *in vitro*.

Item	Torta de Neem, mg/kg MS					MON	EPM	Valor de P		
	0	240	480	720	960			Trat ^b	L ^c	Q ^c
V ₁	98.9	106	86.4	79.3	88.2	81.9	11.48	0.55	0.19	0.72
V ₂	95.0	75.7	92.0	101	94.7	76.3	9.769	0.31	0.43	0.62
K ₁	0.11*	0.11*	0.11*	0.14	0.11*	0.15	0.001	0.0006	0.20	0.31
K ₂	0.03	0.03	0.04	0.05	0.03	0.04	0.007	0.36	0.57	0.38
L	1.19	0.91	0.73	0.81	1.68	1.03	0.377	0.49	0.49	0.09

^aV₁ e V₂ = Volume máximo de produção de gás de cada “pool”, mL; K₁ e K₂ = Taxa específica de digestão de cada “pool”, h⁻¹; L = tempo de “lag”, h;

^bTrat = tratamento; Todas as doses foram comparadas contra MON pelo teste de Dunnett *P<0.05 e **P<0.10;

^cO controle negativo foi usado como tendo 0 mg de torta de Neem nas regressões polinomiais; L = Linear e Q = Quadrático.

O aumento linear da concentração de AGV com a suplementação crescente de torta de Neem (**Tabela 2**) sugere que a atividade enzimática aumentou com a suplementação de torta de Neem. Neste estudo, um evidente caminho metabólico do acetato no rúmen foi predominante com o aumento da dose de suplementação de torta de Neem, mesmo que a dieta estudada tenha baixa inclusão de forragem. Um aumento semelhante nas concentrações de acetato e na proporção de acetato para propionato foi relatado por AKANMU; HASSEN (2018), que avaliaram extratos de plantas *in vitro*. Extrato aquoso da torta de semente de Neem foi relatado como estimulante ou inibidor da atividade enzimática *in vitro* em bactérias do rumen (AGARWAL et al., 1991). Esses autores relataram que enzimas associadas à degradação de fibras no rúmen (carboximetilcelulase e xilanase) foram estimuladas por extratos aquosos frios e quentes de Neem de maneira dependente da dose. Por outro lado, neste mesmo estudo, aquelas enzimas associadas à degradação de amido, proteína e ureia (α -amilase, protease e urease, respectivamente) foram inibidas. As proporções aumentadas de AGVCR encontradas neste estudo corroboram com as proporções aumentadas de acetato e butirato observadas, pois esses componentes do AGVCR podem aumentar a degradação da FDN (ROMAN-GARCIA et al., 2021). Combinando as proporções aumentadas de AGVCR e a cinética de degradação detectada neste estudo, podemos sugerir que a torta de Neem pode ser um aditivo a ser usado durante o período de adaptação das dietas de terminação em sistemas de confinamento, prevenindo a acidose, e para animais em pastagem, uma vez que os AGVCR estão associados à melhora na digestão de fibras.

Embora tenha sido detectada uma concentração aumentada de amônia na inclusão de 480 mg de torta de Neem, houve uma redução da concentração de amônia quando altas doses de torta de Neem foram adicionadas (**Tabela 2**). Isso pode ser explicado pela redução da digestibilidade da PB, conforme relatado por YANG; LAURAIN; AMETAJ (2009), que estudaram o efeito do óleo de Neem na fermentação ruminal em um sistema de cultura contínua. Essa redução da digestibilidade da PB foi atribuída aos efeitos negativos dos compostos fenólicos através da formação de complexos indigestíveis com proteínas (FAGUNDES et al., 2020). Além disso, um estudo de incubação revelou que a presença de folhas ricas em taninos (um composto da torta de Neem) incubadas em sacos de nylon-gaze dentro do rúmen resultou em aumento da atividade da ligase de amônia glutamato (MAKKAR; SINGH; DAWRA, 1988), o que pode reduzir a disponibilidade de amônia no rúmen. A concentração aumentada de amônia detectada para a inclusão de torta de Neem na dose de 480 mg/kg de MS, demonstrou uma alta atividade proteolítica no rúmen, corroborando o resultado do tempo de “lag”.



Tabela 2. Efeito da inclusão de torta de Neem e monensina (MON) sobre a produção de gás (PG), digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS), ácidos graxos voláteis (AGV), ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (AGVCR) e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em um sistema de produção de gás *in vitro*.

Item	Torta de Neem, mg/kg MS							P-value		
	0	240	480	720	960	MON	EPM	Trat ^a	L ^b	Q ^b
PG 24h, mL/g MS	184.1	164.3	163.1	174.5	178.5	154.5	10.05	0.28	0.97	0.13
PG 48h, mL/g MS	193.5	175.9	172.8	181.1	185.6	158.2	12.48	0.40	0.78	0.26
DIVMS, g/kg	666.2	633.8	628.7	643.7	651.8	599.1	22.36	0.33	0.79	0.25
pH	6.36*	6.36*	6.36*	6.35*	6.34*	6.19	0.02	<0.0001	0.47	0.66
AGV total, mM	79.0*	80.2*	80.9*	84.4	83.5**	87.9	1.26	<0.0001	0.001	0.78
AGV, mol/100mol										
Acetato	46.0	45.9	48.7**	48.9*	46.7	45.3	0.98	0.04	0.14	0.06
Propionato	28.2*	28.6*	27.3*	25.7*	27.8*	34.3	0.49	<0.0001	0.02	0.11
Butirato	19.3*	18.9*	18.1*	19.0*	18.9*	15.8	0.55	0.0002	0.69	0.27
Iso-valerato	2.04*	2.00*	1.91	2.27*	2.31*	1.56	0.11	<0.0001	0.03	0.17
Iso-butirato	2.10*	2.09*	1.82*	1.87*	1.98*	1.30	0.08	<0.0001	0.06	0.06
Valerato	2.41*	2.42*	2.15	2.19*	2.31*	1.83	0.10	0.0006	0.19	0.15
AGVCR, mM	3.28*	3.28*	3.02**	3.49*	3.57*	2.51	0.15	<0.0001	0.09	0.12
Acetato:Propionato	1.64*	1.61*	1.79*	1.91*	1.69*	1.33	0.05	<0.0001	0.02	0.03
N-NH ₃ , mg/dL	13.3	16.7*	20.6*	14.5	6.28	8.73	1.99	0.0004	0.02	0.0002

^aTrat = tratamento; todas as doses foram comparadas contra MON pelo teste de Dunnett *P<0.05 e **P<0.10.

^bO controle negativo foi usado como tendo 0 mg de torta de Neem nas regressões polinomiais; L = Linear e Q = Quadrático.

Contrastando aos nossos resultados de emissão de gases de efeito estufa entéricos (**Tabela 3**), AKANMU; HASSEN; ADEJORO (2020) detectaram redução na emissão de CH₄ ao incubar extrato de *Azadirachta indica* com diferentes substratos (de baixa a alta qualidade). Além disso, PATRA; KAMRA; AGARWAL (2006) observaram redução na emissão de CH₄ ao aumentar as doses de extratos de *Azadirachta indica* incubados com palha de trigo e mistura de concentrado em uma proporção de 1:1. O aumento quadrático em CH₄ e CO₂ por MOD, que atingiu o ponto máximo na dose de 480 mg/kg de MS, pode estar associado ao tempo de “lag” e aos níveis de amônia, que atingiram a menor e a maior concentração, respectivamente, na dose de 480 mg/kg de MS. No entanto, não temos uma explicação biológica para esses resultados; no entanto, em nosso entendimento, a torta de Neem na dose de 480 mg/kg de MS pode ter modulado a microbiota ruminal, o que proporcionou esses resultados.



Tabela 3. Efeito da inclusão de torta de Neem e monensina (MON) sobre as emissões de gases de efeito estufa entéricos (CH₄, metano e CO₂, dióxido de carbono) por unidade de matéria orgânica digestível (MOD) em um sistema de produção de gás *in vitro*.

Item	Torta de Neem, mg/kg MS					MON	EPM	Valor de P		
	0	240	480	720	960			Trat ^a	L ^b	Q ^b
CH ₄ , mmol/g MOD	50.0*	55.9*	59.9*	53.4*	54.8*	29.7	1.538	<0.0001	0.14	0.0011
CO ₂ , mmol/g MOD	219.9*	230.6*	234.7*	226.4*	220.9	229.5	1.592	<0.0001	0.70	<0.0001

^aTrat = tratamento; Todas as doses foram comparadas contra MON pelo teste de Dunnett *P<0.05 e **P<0.10.

^bO controle negativo foi usado como tendo 0 mg de torta de Neem nas regressões polinomiais; L = Linear e Q = Quadrático

4. CONCLUSÃO

Na dose mais alta (960 mg/kg MS), a torta de Neem apresentou produção de AGV semelhante à suplementação de monensina. Além disso, à medida que a torta de Neem aumentou, os AGVCR aumentaram linearmente em comparação com a monensina. Adicionalmente, a torta de Neem foi eficaz em aumentar o pH do fluido ruminal em comparação à monensina e aumentou quadraticamente o N-amônia, mas não reduziu as emissões de gases de efeito estufa.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à bolsa concedida pelo CNPq (PIBIC) e ao Instituto de Zootecnia que auxiliou na execução do projeto. Além disso, à bolsa concedida pela FAPESP ao orientador (FAPESP; Processo número: 2022/ 11769–2).

5. REFERÊNCIAS

- AGARWAL, N. et al. Effect of water extracts of neem (*Azadirachta indica*) on the activity of hydrolytic enzymes of mixed rumen bacteria from buffalo. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 57, n. 1, p. 147–150, 1991.
- AKANMU, A. M.; HASSEN, A. The use of certain medicinal plant extracts reduced in vitro methane production while improving in vitro organic matter digestibility. **Animal Production Science**, v. 58, n. 5, p. 900–908, 2018.
- AKANMU, A. M.; HASSEN, A.; ADEJORO, F. A. Gas production, digestibility and efficacy of stored or fresh plant extracts to reduce methane production on different substrates. **Animals**, v. 10, n. 1, p. 4–6, 2020.

AOAC. **Official methods of analysis**. 15th edition. Washington DC: Association of Official Analytical



Chemists, Inc., 1990.

AOAC. Official Methods of Analysis. **18th ed. Gaithersburg (MD)**, 2005.

ARUWAYO, A. Neem (*Azadirachta indica*) Seed Cake/Kernel as Protein Source in Ruminants Feed. **American Journal of Experimental Agriculture**, v. 3, n. 3, p. 482–494, 2013.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical chemistry**, v. 8, p. 130–132, 1962.

DIDA, M. F.; CHALLI, D. G.; GANGASAHAY, K. Y. Effect of feeding different proportions of pigeon pea (*Cajanus cajan*) and neem (*Azadirachta indica*) leaves on feed intake, digestibility, body weight gain and carcass characteristics of goats. **Veterinary and Animal Science**, v. 8, n. June, p. 100079, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100079>>.

EL-HAWARY, S. S. et al. DNA fingerprinting and botanical study of *Azadirachta indica* A. Juss. (neem) family Meliaceae. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2013.09.001>>.

EL-ZAIAT, H. M. et al. Effects of Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Powder Supplementation on Rumen Fermentation, Feed Intake, Apparent Digestibility and Performance in Omani Sheep. p. 1–15, 2022.

FAGUNDES, G. M. et al. Tannin as a natural rumen modifier to control methanogenesis in beef cattle in tropical systems: Friend or foe to biogas energy production? **Research in Veterinary Science**, v. 132, n. December 2019, p. 88–96, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.05.010>>.

GOWDA, S. K.; SASTRY, V. R. B. Neem seed cake in animal seeding-scope and limitations - Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 13, n. 5, p. 720–728, 2000.

GRINGS, E. E.; BLÜMMEL, M.; SÜDEKUM, K. H. Methodological considerations in using gas production techniques for estimating ruminal microbial efficiencies for silage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123- 124 Pa, p. 527–545, 2005.

GUPTA, A. et al. Therapeutics role of neem and its bioactive constituents in disease prevention and treatment. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 680–691, 2019.

JACK, A. A. et al. Growth-promoting effect of water-washed neem (*Azadirachta indica* A. Juss) fruit inclusion in West African dwarf rams. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 6, p. 3467–3474, 2020.

MAKKAR, H. P. S.; SINGH, B.; DAWRA, R. K. Effect of tannin-rich leaves of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. **British Journal of Nutrition**, v. 60, p. 287–296, 1988.

MARTINEZ, S. S. **O Nim – Azadirachta indica – natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: IAPAR, 2002.

MENKE, K. H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. **Animal Research Development**, v. 28, p. 7–55, 1988.

NATH, K.; RAJAGOPAL, S.; GARG, A. K. Water-washed neem (*Azadirachta indica* juss) seed kernel cake as a cattle feed. **The Journal of Agricultural Science**, v. 101, n. 2, p. 323–326, 1983.

NRC. **Nutrient Requirements of Beef Cattle, 8th Revised Edition**. [s.l.] National Academies Press,



2016.

OWENS, F. N.; BASALAN, M. Ruminal Fermentation. In: MILLEN, D. D.; DE BENI ARRIGONI, M.; PACHECO, R. D. L. (Ed.). **Rumenology**. 1. ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 63–102.

PATRA, A. K.; KAMRA, D. N.; AGARWAL, N. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. **Animal Feed Science and Technology**, v. 128, n. 3–4, p. 276–291, 2006.

ROMAN-GARCIA, Y. et al. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. II: Relation with solid passage rate and pH on neutral detergent fiber degradation and microbial function in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 9, p. 9853–9867, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2021-20335>>.

SARKAR, S.; SINGH, R. P.; BHATTACHARYA, G. Exploring the role of Azadirachta indica (neem) and its active compounds in the regulation of biological pathways: an update on molecular approach. **3 Biotech**, v. 11, n. 4, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02745-4>>.

SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of animal science**, v. 72, n. 11, p. 2980–2991, 1994.

TAGLIAPIETRA, F. et al. In vitro rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 3–4, p. 197–201, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.04.003>>.

TAGLIAPIETRA, F. et al. Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48h in situ NDF digestibility and on in vitro 24h gas production methods. **Animal Feed Science and Technology**, v. 170, n. 3–4, p. 182–191, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.09.008>>.

TAGLIAPIETRA, F. et al. High doses of vitamin E and vitamin C influence in vitro rumen microbial activity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, n. 3–4, p. 210–214, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.05.010>>.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of the Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1–3, p. 45–53, 1991.

WYLIE, M. R.; MERRELL, D. S. The Antimicrobial Potential of the Neem Tree Azadirachta indica. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, n. May, p. 1–16, 2022.

YÁÑEZ-RUIZ, D. R. et al. Design, implementation and interpretation of in vitro batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants-a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 216, p. 1–18, 2016.

YANG, W. Z.; LAURAIN, J.; AMETAJ, B. N. Neem oil modulates rumen fermentation properties in a continuous cultures system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 149, n. 1–2, p. 78–88, 2009.