

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

REGIANE BALBINO DOS SANTOS PRIMO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
DO *Crambe abyssinica* NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

MARÇO/2013

REGIANE BALBINO DOS SANTOS PRIMO

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
DO *Crambe abyssinica* NA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTE**

ORIENTADORA: PROF^a. Dra. KELLY CRISTINA DA SILVA BRABES

**CO-ORIENTADOR: PROF^o Dr. RAFAEL HENRIQUE DE TONISSI
E BUSCHINELLI DE GOES**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

DOURADOS/MS

MARÇO 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

636.085 S237c	Santos Primo, Regiane Balbino dos. Caracterização do potencial biotecnológico do <i>Crambe abyssinica</i> na alimentação de ruminante/ Regiane Balbino dos Santos Primo–Dourados, MS: UFGD, 2013. 87 f. Orientadora: Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. <i>Crambe abyssinica</i> . 2. Alimentação de ruminantes 3. Torta de crambe. I. Título.
------------------	--



Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Caracterização do potencial biotecnológico do *Crambe abyssinica* na alimentação de Ruminante**”, de autoria de Regiane Balbino dos Santos Primo, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

Profa. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes
(Orientadora - UFGD)
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Jonas da Silva Mota
Membro Examinador (UEMS)

Prof. Dr. Fabio Juliano Negrão
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 15 de março de 2013.

*Dedico aos meus pais Aparecido e Lindalva,
com o mais profundo amor, admiração e respeito.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que eu alcançasse mais uma conquista.

Aos Meus pais Aparecido dos Santos Primo e Lindalva Balbino da Silva Primo pelo amor, dedicação e motivação em todas as etapas da minha vida.

Aos meus irmãos Renata Balbino dos Santos Primo Miguel e Renan José dos Santos pela amizade e apoio.

Aos meus sobrinhos Augusto, Luiz Octávio e Ysadora por alegrarem minha vida.

Ao meu noivo Rafael Gonçalves Moreno pelo companheirismo, paciência e apoio durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados por terem contribuído para o meu aprendizado durante o mestrado.

Á minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Kelly Cristina da Silva Brabes pela confiança, amizade, paciência e ensinamentos transmitidos durante o mestrado.

Ao prof^º Dr^º Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes pela co-orientação, confiança e realização das análises estatísticas.

Ao profº Drº Fábio Juliano Negrão por ter cedido o espaço laboratorial para as análises microbiológicas.

Ao profº Drº Jonas da Silva Mota docente da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, pela paciência, dedicação conselhos e ensinamentos transmitidos com convicção durante as análises laboratoriais, e por ter realizado os testes de Triagem fitoquímica, Análise dos extratos via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A professora Drª Claudia Andréa Lima Cardoso, docente da UEMS por desenvolver as análises do extrato hexânico via Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas realizada no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao professor Drº Andersson Barison por desenvolver as análises de RMN das amostras no Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná-Curitiba.

As minhas amigas Késia e Chaiane por terem auxiliado nos árduos procedimentos e análises laboratoriais, a Cibelli, Lujan, Maisa, Agruslavia, Flora, Débora, Laís, Ronaldo, Karla, Thiago e Quézia por terem proporcionado momentos felizes e de descontração. A todos nem tenho palavras a agradecer pela amizade, apoio, paciência e incentivo.

Aos mestrandos de zootecnia Rosielen Augusto Patussi e Thiago José de Cardoso Lira pelas coletas do líquido ruminal e por sempre se mostrarem

dispostos a ajudar. A Técnica de Laboratório de Nutrição Animal Maria Giselda M. Gressler pelo auxílio.

Aos alunos de Iniciação Científica Giuliane e Caio pelo auxílio nos procedimentos químicos.

Ao Antônio Novaes pelos esclarecimentos de dúvidas quanto a realização de testes microbiológicos.

Ao aluno de iniciação científica Gustavo por ter auxiliado na trituração dos grãos de Crambe.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária por ceder o aparelho liofilizador.

A coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, pela concessão da bolsa.

Enfim a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV	Ácidos Graxos Voláteis
ANP	Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Combustível.
ATCC	American Type Culture Collection
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CNF	Carboidratos Não Fibrosos
CPP	Contagem Padrão em Placa
DIVMS	Digestibilidade <i>IN VITRO</i> da Matéria Seca
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extrato Etéreo
ENN	Extrato Não Nitrogenado
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
HCEL	Hemicelulose
ITC	Isotiocianatos
LIG	Lignina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
MM	Matéria Mineral
MS	Matéria Seca
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
PB	Proteína Bruta
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
PNDR	Proteína Não Degradável no Rúmen
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados da triagem fitoquímica com reagentes.....	47
Tabela 2: Resultados da difusão em disco do extrato etanólico e frações hexânica e hidroalcoólica de grãos de <i>Crambe abyssinica</i>	50
Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico e cinco frações frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 27664, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 1706, <i>Candida albicans</i> ATCC 90028, <i>Aspergiullus niger</i> ATCC 6275 e <i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 1871.....	53
Tabela 4: Alcalóides presentes na fração hidroalcoólica.....	55
Tabela 5: Atividade antimicrobiana dos alcalóides presentes na fração hidroalcoólica sobre <i>Candida albicans</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico e demais frações frente a microrganismos Gram-negativos e fungo filamentosos isolados do rúmen.	56
Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima de ácido palmítico em <i>S. aureus</i> ATCC 27664 <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706, <i>C. albicans</i> ATCC 90028, <i>Aspergiullus niger</i> ATCC 6275 e <i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 1871.....	57

APÊNDICE

Tabela 8: Coletas referentes a diferentes concentrações de torta de <i>Crambe abyssinica</i> , CPP, FFL e pH.....	77
Tabela 9: Composição da ração referente aos diferentes tratamentos.....	80
Tabela 10: Teores em percentagem, da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), hemicelulose (HCEL), lignina (LIG), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT), digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (DIVMS), Extrativo não nitrogenado (ENN) e matéria mineral (MM) dos concentrados.....	81
Tabela 11: Análise de Variância de regressão.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bovino submetido á avaliação de dietas através de coleta em fistula de borracha KHEL.....	33
Figura 2: Fluxograma correspondente ás partições líquido-líquido do extrato etanólico de grãos de <i>Crambe abyssinica</i>	35
Figura 3: pH inicial dos tratamentos correspondentes aos tempos de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos.....	41
Figura 4: pH final dos tratamentos correspondentes aos tempos de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos.....	41
Figura 5: Concentração de Nitrogênio Amoniacal do líquido ruminal de bovinos em relação aos tratamentos em diferentes tempos de coletas.....	43
Figura 6: Contagem Padrão em Placa (CPP) total de microrganismos do rúmen, em função dos diferentes tratamentos e intervalo de tempos de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos.....	44
Figura 7: Contagem de fungos filamentosos e leveduras em função das diferentes concentrações de torta de <i>Crambe abyssinica</i> e do tempo de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos.....	45
Figura 8: Simulação da equação da reta referente às concentrações de torta de Crambe e o crescimento microbiano (CPP).....	46
Figura 9: Cromatograma (254 nm) das frações hidroalcoólica (1), Acetato de etila (2), Clorofórmica (3), hexânica (4) e extrato etanólico (5) via CLAE.....	84
Figura 10: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da substância da fração acetato de etila (400 MHz, CDCl_3).....	85
Figura 11: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da substância da fração clorofórmica, (400 MHz, CDCl_3).....	85
Figura 12: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância do extrato etanólico (400 MHz, CDCl_3).....	86
Figura 13: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância da fração hexânica (400 MHz, CDCl_3).....	86
Figura 14: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância da fração hidroalcoólica (400 MHz, DMSO-d_6).....	87

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a cinética do crescimento da microbiota total, fungos filamentosos e leveduras do rúmen de bovinos tratados com diferentes concentrações de torta de *Crambe abyssinica* e avaliar a ação antimicrobiana do extrato e frações de grãos de Crambe em *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 e microrganismos isolados do rúmen. Para avaliação do crescimento microbiano ruminal foram analisados seis tratamentos com diferentes inclusões de torta de Crambe em substituição ao farelo de soja, Tratamento 1 (0%), Tratamento 2 (2,5%), Tratamento 3 (5%), Tratamento 4 (10%), Tratamento 5 (15%) e Tratamento 6 (apenas líquido ruminal) nos tempos 0, 30, 60, 120 e 240 minutos. O experimento foi realizado em triplicata. Para o teste da atividade antimicrobiana foram utilizadas técnicas de difusão em disco com o extrato etanólico, frações hexânica e hidroalcoólica, e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) que foi desenvolvida com o extrato etanólico, frações hexânica, acetato de etila, clorofórmica e hidroalcoólica. Foi realizada a CIM do ácido palmítico para verificar se a atividade antifúngica na fração hexânica estava relacionada à sua presença. Os resultados da cinética do crescimento microbiano total no tempo de 120 minutos nos tratamentos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 foram 10,34; 8,61; 8,89; 9,12; 7,98 e 8,68 respectivamente, quanto aos fungos filamentosos e leveduras 3,13; 3,12; 3,18; 3,11; 3,14 e 3,24 respectivamente. Os resultados da difusão em disco permitiram observar halo de inibição do extrato etanólico sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 90028, fração hidroalcoólica sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 e *Candida albicans* ATCC 90028. Na CIM o extrato etanólico inibiu *Escherichia coli* ATCC 25922 (12,5 mg/mL), *Candida albicans* ATCC 90028 (25 mg/mL); fração hidroalcoólica *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 (6,25 mg/mL), *Candida albicans* ATCC 90028 (25 mg/mL); fração hexânica *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 (25 mg/mL); fração clorofórmica *Candida albicans* ATCC 90028 (1,56 mg/mL), *Aspergillus niger* ATCC 6275 (6,25 mg/mL); fração acetato de etila *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 (3,12 mg/mL). As análises de CIM mostraram que o extrato etanólico e as demais frações em estudo não apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos Gram-negativos isolados do rúmen. Porém todos com exceção da fração hidroalcoólica, exibiram atividade antifúngica sobre o microrganismo filamentoso isolado deste ambiente. A atividade antimicrobiana do ácido palmítico foi demonstrada sobre *Candida albicans* ATCC 90028 (0,5 mg/mL) e *Aspergillus niger* ATCC 6275 (1 mg/mL), não havendo atividade antimicrobiana nos isolados ruminais. As concentrações da torta de *Crambe* proporcionaram crescimento da microbiota ruminal com exceção dos tratamentos 2 e 5. Os extratos provenientes dos grãos de *Crambe abyssinica* exibiram atividade antimicrobiana e antifúngica de microrganismos ATCCs, o que é considerado um ótimo resultado, necessitando de novos estudos quanto a sua aplicação farmacológica.

Palavras-chave: extratos, antimicrobianos, ruminantes, torta.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the growth kinetics of total microbiota, filamentous fungi and yeasts in the rumen of cattle treated with different concentrations of *Crambe abyssinica* pie and evaluate the antimicrobial activity of Crambe grains extract and fractions in *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275, NRRL 1871 and *Fusarium oxysporum* and rumen isolated microorganisms. For rumen microbial growth evaluation, six treatments were analyzed with different Crambe pie inclusions to replace soybean meal, Treatment 1 (0%), Treatment 2 (2.5%), Treatment 3 (5%), Treatment 4 (10%), Treatment 5 (15%) and Treatment 6 (only ruminal fluid) at 0, 30, 60, 120 and 240 minutes. The experiment was performed in triplicate. To test the antimicrobial activity were used disk diffusion techniques with the ethanolic extract, hexane and hydroalcoholic fractions, and minimum inhibitory concentration determination (MIC) which was developed with the ethanolic extract, hexanic, ethyl acetate, chloroformic and hydroalcoholic fractions. We performed the palmitic acid MIC to verify if the antifungal activity in the hexane fraction was related to its presence. The total growth microbial kinetics results at the time of 120 minutes in the treatments 1, 2, 3, 4, 5 and 6 were 10.34, 8.61, 8.89, 9.12, 7.98 and 8.68 respectively, as the filamentous fungi and yeasts 3.13, 3.12, 3.18, 3.11, 3.14 and 3.24 respectively. The disk diffusion results allowed observing the ethanol extract inhibition zone on *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 90028, hydroalcoholic fraction on *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 and *Candida albicans* ATCC 90028. At the MIC the ethanolic extract inhibited *Escherichia coli* ATCC 25922 (12.5 mg/mL), *Candida albicans* ATCC 90028 (25 mg/mL); hydroalcoholic fraction *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 (6.25 mg/mL), *Candida albicans* ATCC 90028 (25 mg/mL); hexanic fraction *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 (25 mg/mL); chloroformic fraction *Candida albicans* ATCC 90028 (1.56 mg/mL), *Aspergillus niger* ATCC 6275 (6.25 mg/mL); ethyl acetate fraction *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 (3.12 mg/mL). The MIC analyzes showed that the ethanol extract and the other fractions in study showed no antimicrobial activity against the rumen isolated Gram-negative microorganisms. But all except the hydroalcoholic fraction, exhibited antifungal activity on the filamentous microorganism isolated from this environment. The palmitic acid antimicrobial activity was demonstrated on *Candida albicans* ATCC 90028 (0.5 mg/mL) and *Aspergillus niger* ATCC 6275 (1 mg/mL), with no antimicrobial activity on rumen isolates. The Crambe pie concentrations provided ruminal microbial growth except for treatments 2 and 5. The extracts from the *Crambe abyssinica* grains exhibited antimicrobial and antifungal activity of microorganisms ATCCs, which is considered a good result, requiring further studies regarding its pharmacological application.

Keywords: extracts, antimicrobial, ruminants, pie.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 <i>Crambe abyssinica</i>	15
3.2 <i>Crambe abyssinica</i> na produção do biodiesel	16
3.3 Caracterização dos processos digestivos em ruminantes.....	18
3.4 Uso de torta de <i>Crambe abyssinica</i> em rações para animais ruminantes....	22
3.5 Atividade biológica do <i>Crambe abyssinica</i>	24
3.5.1 Terpenos	25
3.5.2 Compostos fenólicos.....	25
3.5.3 Alcalóides.....	26
3.6 Metabolismo secundário X Microrganismos Patogênicos	27
3.7 Metabolismo secundário de <i>Crambe abyssinica</i>	28
3.8 Análise fitoquímica	28
3.8.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas	29
3.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	30
3.8.3 Ressonância Magnética Nuclear.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	32

4.1 Procedimento experimental.....	32
4.2 Preparo do extrato etanólico de <i>Crambe abyssinica</i> e partições líquido-líquido	34
4.3 Triagem Fitoquímica	36
4.4 Análise do Extrato Hexânico via Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas	36
4.5 Análise dos Extratos via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)..	37
4.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	37
4.7 Fracionamento da fração hidroalcoólica para determinação de alcalóides..	37
4.8 Testes de atividade antimicrobiana.....	38
4.8.1 Difusão em Disco	38
4.8.2 Concentração Inibitória Mínima.....	39
4.9 Análise Estatística.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 Triagem fitoquímica.....	46
5.2 Análise da fração hexânica via CG-MS.....	47
5.3 Análise via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	48
5.4 Ressonância Magnética Nuclear.....	49
5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana	49
5.6 Fracionamento da fração hidroalcoólica para determinação de alcalóides	55
6 CONCLUSÃO	59
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8 APÊNDICE.....	77

1 INTRODUÇÃO

Os impactos ambientais causados pelo uso de combustíveis fósseis tem motivado estudos e pesquisas de biocombustíveis, de modo a encontrar alternativas que sejam economicamente viáveis, apresentando produção em larga escala, balanço energético positivo e benefícios ambientais (WAZILEWSK *et al.*, 2012). No Brasil, a principal matéria-prima responsável pela produção do biodiesel é a soja, porém há um grande interesse por oleaginosas não comestíveis (SOUZA *et al.*, 2009). Nesse contexto surge o *Crambe abyssinica* que possui elevado potencial para produção do biodiesel devido ao seu rápido ciclo de produção, baixo custo de investimento e elevado teor de óleo (MARTINS *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012 a).

Devido ao acelerado crescimento agroindustrial no Brasil, a produção de tortas provenientes da fabricação do biodiesel corresponderá em 2013, a cerca de 8,9 milhões de toneladas de resíduos que podem ser descartados no ambiente (CARRERA *et al.*, 2012). Subprodutos provenientes da produção do biodiesel podem ser utilizados na alimentação de animais ruminantes (PERIPOLLI *et al.*, 2011). Estudos demonstram que a torta de Crambe, apresenta potencialidade para ser inserida na dieta desses animais (SOUZA *et al.*, 2009). Em seus grãos são encontradas proteínas, fibras e glucosinolatos. Os glucosinolatos podem provocar toxicidade em animais monogástricos, já os ruminantes toleram níveis mais elevados devido a sua degradação por microrganismos do rúmen, porém existem restrições quanto ao seu uso devido ao fator anti-nutricional (LAZZERI *et al.*, 1994; CLEEMPUT, 2011; ABBEDDOU *et al.*, 2012).

Os microrganismos ruminais são representados por bactérias, fungos e protozoários, desempenham como principal função a fermentação e degradação dos alimentos a fim de produzir os ácidos graxos voláteis, que são a principal fonte de energia para esses animais (RUIZ, 1992; PARISH, 2011).

Além da utilização da torta na dieta de animais ruminantes, o óleo de Crambe apresenta metabolismo secundário como os glucosinolatos, esses por sua vez podem apresentar diversas atividades biológicas inclusive antimicrobianas (RAMPAL *et al.*, 2012). Dessa forma esse trabalho tem o objetivo de avaliar a cinética do crescimento da microbiota ruminal em relação às diferentes concentrações da torta de Crambe, e analisar o potencial antimicrobiano dos grãos dessa oleaginosa sobre cepas ATCCs e isolados do rúmen.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral: Avaliar a cinética da microbiota ruminal total de bovinos tratados com torta de *Crambe abyssinica* e determinar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e diferentes frações nos grãos de Crambe.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética do crescimento *in vitro* da microbiota ruminal de bovinos tratados com diferentes concentrações de torta de *Crambe abyssinica*.
- Determinar a cinética do crescimento *in vitro* de fungos filamentosos e leveduras provenientes da microbiota ruminal tratados com diferentes concentrações de torta de *Crambe abyssinica*.
- Verificar a caracterização química do extrato etanólico e frações hexânica, acetato de etila, clorofórmica e hidroalcoólica de grãos de *Crambe abyssinica*.
- Avaliar a concentração inibitória mínima do extrato etanólico, e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica de grãos de *Crambe abyssinica* sobre cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 1706, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Fusarium oxysporum* NRRL 1871, e microrganismos isolados do rúmen.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Crambe abyssinica*

A *Crambe abyssinica* é uma planta oleaginosa pertencente à família das Brassicáceas anteriormente denominadas Crucíferas. Originária do Mediterrâneo na região da Ásia e Europa Ocidental apresenta as seguintes características: ciclo de produção curto variando de 90 a 100 dias, rápida adaptação a condições climáticas antagônicas, baixo custo de investimento e alto rendimento na produção (MARTINS *et al.*, 2011). Seu cultivo começou em 1933 na antiga União Soviética (WEISS, 2000). Havendo evidências de pesquisas experimentais na Rússia, Suécia e Polônia após a segunda guerra mundial (FALASCA *et al.*, 2010).

No Brasil o cultivo de *Crambe* teve início nos anos 90 no estado do Mato Grosso do Sul, igualmente sendo cultivado na região sul e sudeste (ONOREVOLI, 2012). Porém estudos quanto à cultura e produção do óleo de *Crambe* vem sendo desenvolvidos recentemente, após produtores e pesquisadores terem acesso a cultivar FMS Brilhante, comercializada pela Fundação Mato Grosso do Sul (OLIVA, 2010).

Essa planta apresenta porte ereto, podendo exibir 1 a 2 m de altura, dependendo da época e densidade de plantio. Suas folhas são grandes e largas, flores brancas ou amarelas, sementes cor castanho esverdeado de estrutura esférica de 0,8- 2,6 milímetros de diâmetro. As raízes podem chegar a mais de 15 cm de profundidade, o que lhe confere tolerância em períodos secos (FALASCA *et al.*, 2010). Crescem em locais cuja precipitação varia de 350 a 1200 mm, temperatura média anual de 5,7 a 16,2 °C e solos com pH em torno de 5,0-7,8; sendo a umidade representada por 14% considerada perfeita para seu desenvolvimento. É considerado uma cultura de inverno quando não

está em condições de temperatura inferior a 6 °C, exceto na fase de plântula onde pode tolerar até 5°C (FALASCA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2011).

Considerado um importante promissor industrial, os grãos de Crambe apresentam 23-38% de óleo, contendo cerca de 50-60% de ácido erúico (C_{22:1}), tornando seu consumo inadequado na alimentação humana (OPLINGER *et al.*, 1991; BASSO, *et al.*, 2012). Além do ácido erúico, o óleo de Crambe ainda pode apresentar quantidades consideráveis de outros ácidos graxos como o Ácido Oléico (C_{18:1}), Linoléico (C_{18:2}) e Linolênico (C_{18:3}) respectivamente 17,2%, 8,7 % e 5,2 % (SPRINGDALE, 2005).

O óleo extraído é utilizado para diversas finalidades, tais como lubrificante industrial, inibidor de corrosão, fabricação de borracha sintética, além de ser empregado na produção do biodiesel (OPLINGER *et al.*, 1991; COSTA *et al.*, 2012 a). Pesquisa realizada pela fundação MS indica que o Crambe possui uma rentabilidade de 1.000 a 1.500 Kg/ ha⁻¹. Jasper *et al.* (2010 a) apontam um rendimento de 1.507,05 Kg/ha⁻¹, com 33,98% de teor de óleos, resultando numa produtividade maior que 500 L ha⁻¹.

3.2 *Crambe abyssinica* na produção do biodiesel

A crescente preocupação mundial com os impactos ambientais, e a constante busca por fontes de energia renováveis tem atraído atenção aos biocombustíveis (WAZILEWSK *et al.*, 2012). Os principais biocombustíveis comercializados no Brasil são representados pelo etanol e biodiesel (WILKINSON *et al.*, 2010) .

O ingresso do biodiesel na matriz energética brasileira adveio do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB) criado por Decreto Lei em 23 de dezembro de 2003 e concluído pela Lei nº 11.097 de 13 de janeiro de 2005. A Agência Nacional de Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) tornou obrigatória a adição de 5% de biodiesel ao óleo

diesel, buscando desta forma diminuir a emissão de dióxido de carbono proveniente da queima do diesel fóssil (ANP, 2011).

Quimicamente o biodiesel é um mono-álquil éster de ácidos graxos derivado de óleos vegetais, gorduras animais e/ ou residuais, cuja utilização está ligada a substituição parcial ou total de combustíveis de origem fóssil em motores de ignição por compressão. Pode ser produzido através de dois processos, a transesterificação dos triagliceróis de óleos e gorduras por meio de solventes alcoóis (etanol ou metanol), procedimento que gera co-produtos como o glicerol e subprodutos como o farelo, e processo de prensagem onde a extração do óleo da origem a torta como resíduo (BRASIL, 2005; KNOTHE *et al.*, 2007; LÔBO *et al.*, 2009). Para Carlsson *et al.* (2011), o óleo de plantas gera insumos químicos como substitutos renováveis a fim de suprir combustíveis fósseis, porém deve ser levado em consideração o seu potencial para produção.

No Brasil a principal fonte de óleo vegetal responsável por maior produção industrial de biodiesel é a soja. Contudo há um grande interesse por oleaginosas que produzam óleos não comestíveis, pois um dos principais problemas enfrentados na cadeia do biodiesel é a falta de matéria-prima (SOUZA *et al.*, 2009). Nesse contexto surge o *Crambe abyssinica* com elevado potencial para produção do biodiesel. Através de análises físico-químicas do óleo de Crambe, constatou-se que essa oleaginosa encontra-se de acordo com as normas estabelecidas na Resolução nº 7 da ANP (JASPER, 2009b).

Um dos principais problemas gerados na produção do biodiesel é a degradação oxidativa e microbiana, pois são capazes de provocar aumento da viscosidade, elevação da acidez e formação de gomas indesejáveis de compostos poliméricos, atingindo negativamente o mercado consumidor (MONYEM *et al.*, 2001; TANG *et al.*, 2008).

O biodiesel de Crambe apresenta maior estabilidade à oxidação de ácidos graxos do que o biodiesel de soja (WAZILEWSKI *et al.*, 2013). Isso está relacionado ao óleo de Crambe, que contém maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados, pois a intensidade de oxidação é provocada pelo

aumento do número de duplas ligações na cadeia do ácido graxo, ou seja, poli-insaturados (ONOVEROLLI, 2012).

Lalas *et al.* (2012) também verificaram uma maior resistência do óleo de Crambe à oxidação quando comparado ao óleo de oliva através do método Rancimat, identificaram também elevada percentagem de ácido erúcico, e elevados níveis de fitosteróis (β -sitosterol, campestanol) e brassicasterol. Além dessas vantagens a produção do biodiesel de Crambe gera subprodutos como a torta e farelo que podem ser inseridos na dieta de ruminantes.

3.3 Caracterização dos processos digestivos em ruminantes

Os animais ruminantes apresentam um estômago dividido em quatro compartimentos: rúmen, retículo, omaso e abomaso, por isso denominados poligástricos (OYELEKE *et al.*, 2008).

O retículo encontra-se próximo ao diafragma e ao coração e as pregas rúmen-reticular mantém sua comunicação com o rúmen, permitindo que tenha similar função de câmara de fermentação. O omaso promove o maceramento, compressão e absorção dos alimentos, reduzindo a partícula de digesta e seu excesso de água antes que chegue ao abomaso. O abomaso por sua vez é o estômago verdadeiro, onde os ácidos e enzimas são secretados para digerir a digesta, funcionando de forma muito similar aos estômagos de animais monogástricos (ONWUKA *et al.*, 2013).

O rúmen representa o maior compartimento, e é caracterizado por conter microrganismos anaeróbicos como bactérias, fungos e protozoários. Funciona como uma câmara de fermentação, onde os alimentos desempenham uma quimiotaxia positiva em relação aos microrganismos presentes (RUIZ, 1992; PARISH, 2011). A finalidade destes microrganismos é fermentar e quebrar as paredes celulares dos vegetais em suas frações de carboidratos e produzir os ácidos graxos voláteis (AGV) que são essenciais fontes de energia para os animais (PARISH, 2011). Geralmente os carboidratos fermentados correspondem 60-70% de ácido acético, 18-22% de ácido propiônico, 12-16% de ácido butírico e 2- 4% de ácido valérico (GOULART *et al.*, 2011).

Quando há deficiência de carboidratos os microrganismos tendem a fermentar os aminoácidos que logo são desaminados dando origem à produção de amônia (BARBOSA *et al.*, 2004). Os aminoácidos liberados e a amônia produzida constituem a maior fonte de compostos nitrogenados e são empregados na síntese de proteína microbiana, exibindo aminoácidos diferentes da fonte dietética. Sendo assim a contribuição final de proteína para o intestino delgado é formado pela proteína dietética e microbiana (NETO *et al.*, 2008).

A degradação da proteína dietética do rúmen influencia na sua fermentação e no suprimento intestinal de aminoácidos. Os constituintes dietéticos representados por proteína degradável (PDR) e não degradável (PNDR) no rúmen apresentam funções distintas. A PDR permite a junção de peptídeos, aminoácidos livres e amônia para o crescimento microbiano e a PNDR fornecem peptídeos e aminoácidos no intestino (CAMPOS *et al.*, 2007a).

A proteína microbiana apresenta alta qualidade de aminoácidos para absorção, correspondendo em média a 59% da proteína que chega ao intestino delgado (SERRANO *et al.*, 2011). Porém as alterações nas taxas de digestão dos alimentos e das frações de carboidratos, que são a fonte de energia mais importante para o crescimento microbiano, afetam negativamente o fornecimento de proteína microbiana ao intestino delgado, conseqüentemente interferindo no desempenho do animal (DE SÁ, 2007).

Quando a percentagem de proteína na dieta encontra-se abaixo de 12%, ou há queda da disponibilidade de compostos nitrogenados (N), pode ocorrer um decréscimo na digestão da fibra, ocasionando restrição no consumo devido à lenta passagem dos alimentos pelo rúmen. Porém elevados níveis de N podem provocar toxicidade devido o excesso de amônia liberada, o que representa mais um fator redutor do consumo (WIDIAWATI, 2012). Para Pimentel *et al.* (2012) a concentração ruminal de amônia pode indicar fermentação de aminoácidos, alto teor de proteína degradável ou ainda, queda na quantidade de carboidratos não fibrosos no rúmen.

Cerca de 60 a 92% de N contido na dieta do animal é convertido em Nitrogênio amoniacal no ecossistema do rúmen (RUIZ, 1992). A manutenção

adequada da concentração do nitrogênio amoniacal torna-se muito importante para o crescimento bacteriano, já que representa 40 a 100% do nitrogênio exigido pelos microrganismos (ÍTAVO *et al.*, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2009). Valores de pH também influenciam na degradação da fração fibrosa quando atingem o intervalo entre 5,0 ou 5,5, inibindo o crescimento de bactérias celulolíticas e a digestão da fibra. A produção de AGV mais acelerada e menos regular ao decorrer do dia também interfere no desenvolvimento desses microrganismos (FONSECA *et al.*, 2001; SILVEIRA, 2009).

O processo de digestão inicia-se quando o alimento é transportado para o complexo retículo-rúmen e retornam para a boca, logo são mastigados novamente, e transferidos para o omaso. No omaso o alimento é triturado em pedaços ainda menores por poderosos movimentos musculares, e então encaminhado para o abomaso sendo dividido pelas enzimas digestivas principalmente pelas lisozimas, passando então para o intestino delgado onde o material não aproveitado é eliminado como fezes (RINEHART, 2008).

O rúmen é um ambiente complexo, composto por populações de bactérias fungos e protozoários anaeróbicos que estabelecem entre si diversas interações. As populações de microrganismos podem sofrer alterações dentro do mesmo animal após a última alimentação (SERRANO *et al.*, 2011).

Muitos protozoários apresentam interações, digerindo as bactérias causam a queda da biomassa bacteriana no líquido ruminal, perda de N pelo hospedeiro e conseqüentemente reduz o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado, tanto pela menor população bacteriana quanto pela retenção dos protozoários no rúmen. Mesmo com essas desvantagens citadas, a presença de protozoários contribui para a fermentação, além de ser uma fonte contínua de nitrogênio para as bactérias após sua morte e degradação, o que favorece os animais com dietas pobres em proteína (SERRANO *et al.*, 2011; SALAS, *et al.*, 2012).

Os protozoários podem interferir na redução da taxa de digestão do amido e conseqüentemente na queda de acidoses em dietas com elevada quantidade de concentrados (formulações balanceadas de alimentos fornecidos a animais/ também denominados como rações) (MENDONZA *et al.*,

1993). A eliminação de protozoários influencia em um considerável aumento de fungos no rúmen, esses fungos podem compensar a queda da atividade celulolítica causada pela desfaunação de protozoários (FONSECA *et al.*, 2001). O número de protozoários e fungos anaeróbios no rúmen esta relacionados principalmente a dieta, pois os protozoários apresentam maior proporção quando a dieta é rica em concentrado e pobre em fibra, o que é visto inversamente quando há predominância de fungos (RUIZ, 1992).

Os fungos anaeróbicos podem representar até 8% da biomassa microbiana presente no ecossistema ruminal de animais que recebem dieta rica em fibras (ABRÃO *et al.*, 2010). Os mesmos solubilizam a parede celular de plantas *in vivo* e *in vitro*, estando envolvidos na degradação da lignina e celulose (OLIVEIRA *et al.*, 2013). ABRÃO *et al.* (2010) buscando avaliar características estruturais de fungos anaeróbios no conteúdo ruminal de bovinos de corte, identificaram a presença de 56,5% de fungos monocêntricos e 26,1% policêntrico, justificando a alta prevalência e presença desses microrganismos a dieta rica em fibras. Apesar da ação de protozoários e fungos no rúmen, as bactérias são os microrganismos mais abundantes e ativos na atividade enzimática (HIGUERA, 2012).

A maioria das bactérias encontradas no ambiente ruminal são anaeróbias estritas, com raras exceções de anaeróbias facultativas. Já as aderidas na parede do rúmen são em grande parte representadas por anaeróbias facultativas e possuem atividade ureolítica (RUIZ, 1992; ANDRIGUETTO *et al.*, 2002).

As bactérias apresentam como uma de suas principais atividades a degradação da celulose. A fermentação no rúmen ocorre por um processo anaeróbio, em temperatura entre 38° e 42°C facilitando os processos fermentativos, o pH mais frequentemente encontrado nesse ecossistema varia de 6,8 a 6,9 e a saliva atua como substância tampão, contribuindo desta maneira para a manutenção de um pH estável (RUIZ, 1992; ANDRIGUETTO *et al.*, 2002).

Existem onze grupos de bactérias que são classificados em função do substrato que fermentam: bactérias celulolíticas, hemicelulolíticas,

pectinolíticas, amilolíticas, ureolíticas, metanogênicas, sacarolíticas, acetolíticas, proteolíticas, amoniagênicas e lipolíticas (TEIXEIRA, 1997). Porém os principais grupos são representados pelas bactérias celulolíticas e amilolíticas (WEIMER *et al.*, 1996; HIGUERA, 2012).

As bactérias celulolíticas degradam a celulose, são anaeróbicas estritas e o pH considerável ótimo para seu crescimento situa-se entre 6,3 e 6,8, utilizam a celobiose que é encontrada em grande proporção no ecossistema ruminal. Certas bactérias celulolíticas como no caso da *Bacterioides succinogenes* podem atuar na degradação do amido (TEIXEIRA, 1997; HIGUERA, 2012).

As bactérias amilolíticas degradam o amido através da enzima extracelular amilase e são menos sensíveis às variações de pH ruminal com um valor de crescimento ótimo variando entre 5,5 e 6,6 (HIGUERA, 2012).

3.4 Uso de torta de *Crambe abyssinica* em rações para animais ruminantes

A soja é um dos alimentos mais utilizados para formulações de rações, mas devido ao seu elevado custo, há a necessidade de estudos para encontrar alternativas mais viáveis que forneçam boa qualidade nutricional, baixo valor agregado e alto rendimento, de modo a aprimorar os resultados da produção agropecuária (ANDRIGUETTO *et al.*, 2002).

No Brasil a produção de resíduos e subprodutos agroindustriais vem aumentando em consequência da crescente industrialização. Estima-se que o país produzirá em 2013 cerca de 8,9 milhões de toneladas de torta de oleaginosas geradas a partir da produção do biodiesel (CARRERA *et al.*, 2012).

Os subprodutos oriundos da cadeia do biodiesel apresentam potencial para serem utilizados como fontes de nutrientes para animais ruminantes. Essa alternativa tende a viabilizar o sistema de produção para pequenos e médios produtores, contribuindo também na redução de acúmulos de resíduos no ambiente (PERIPOLLI *et al.*, 2011).

Souza, *et al.* (2009) afirmam que a torta de *Crambe abyssinica* surge como uma alternativa na alimentação animal, devido à existência de elevados

teores de proteína bruta, carboidratos e fibras. Esses subprodutos provenientes da cadeia do biodiesel podem conter 40% de proteína, 27% de fibras e 4% de glucosinolatos (DAUBOS *et al.*, 1998).

Conforme relatado por Mizubuti *et al.* (2011) co-produtos como a torta de soja apresenta maior taxa de degradação de carboidratos não fibrosos (CNF) do que a torta de Crambe. Já as maiores taxas de degradação dos carboidratos fibrosos (CF) foram observadas em ambos, apresentando também melhor perfil na cinética de fermentação ruminal no que se refere à CF e CNF, quando comparados aos demais subprodutos estudados como farelo de crambe, farelo de algodão e torta de girassol.

Em estudo realizado por Goes *et al.* (2010) a torta de Crambe apresentou 52,80% de proteína bruta (PB), 48,90% de fibra em detergente neutro (FDN) e 37,15% de fibra em detergente ácido (FDA). Já para a torta de soja os valores de (FDN) e (FDA) foram 12,32 e 8,76 respectivamente. Segundo Carlson *et al.* (1996) a PB e FDN do Crambe apresenta degradabilidade maior que o farelo de soja. Esses autores verificaram também que o grão e a casca de Crambe interferem na digestibilidade, representando valores de 44,5 e 57,3% respectivamente. Já para o farelo de grãos descascados, esse número torna-se maior correspondendo a 85%.

Souza *et al.* (2009) constataram que entre as oleaginosas pinhão manso e nabo-forrageiro, o Crambe obteve maior teor de lipídios nos grãos e também apresentou maiores valores de fibras alimentares após extração do óleo por prensagem a frio, isso devido a sua casca ser muito rica em fibras.

O uso da torta e farelo de Crambe não foi aprovado para animais monogástricos, devido à presença de glucosinolatos, que decompostos no sistema digestivo são transformados em substâncias tóxicas, consideradas antinutricional que podem causar danos ao fígado, rim e redução do apetite (MOHAMED *et al.*, 2009).

Os ruminantes podem tolerar níveis mais elevados de glucosinolatos, devido sua degradação por microrganismos ruminais. Porém seu uso é limitado, pois quando os glucosinolatos sofrem hidrólise enzimática por mirosinase produzem os isotiacianatos, tiocianatos e nitrilos que afetam de

maneira negativa a qualidade nutricional, vindo a reduzir a palatabilidade, provocando inibição do crescimento e alterações patológica em órgão corporais comprometendo o desempenho do animal (LAZZERI *et al.*, 1994; CLEEMPUT, 2011; ABBEDDOU *et al.*, 2012).

Alguns estudos relatam que a introdução de 5% e 10% de farelo de Crambe na dieta de ruminantes não afeta o consumo da ração, eficiência alimentar e hormônios tireoidianos (CARLSON *et al.*, 1996). Em vacas leiteiras um nível de 11 $\mu\text{mol g}^{-1}$ deve ser seguro, mas superiores a 11,7 pode reduzir o consumo de ração e a produção de leite em vacas (BUSCH *et al.*, 1978). Em bezerros dietas contendo 1,2 - 2,4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ de glucosinolatos não interferem no peso e funções da tireoide e fígado (ANDERSSEN *et al.*, 1985). Mesmo que os animais ruminantes sejam menos sensíveis aos glucosinolatos, podem ocorrer intoxicações. Devido a isso vários métodos são realizados a fim de remover ou reduzir o teor desses compostos, buscando minimizar os efeitos na saúde e produção animal (TRIPATHI, 2007).

3.5 Atividade biológica do *Crambe abyssinica*

As plantas apresentam metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário corresponde ao conjunto de processos metabólicos que desempenham função essencial para a vida do vegetal. Já o metabolismo secundário, permite aos vegetais a produção de distintos compostos de natureza química. Alguns destes produtos desempenham funções ecológicas como atraentes e repelente de animais, agindo como mecanismo de defesa das plantas contra insetos herbívoros impedindo o ataque de patógenos, porém outros compostos apresentam um importante papel na indústria cosmética e farmacêutica (GARCÍA *et al.*, 2009).

Os metabólitos secundários são representados por três grandes grupos, terpenos, alcalóides e compostos fenólicos que podem apresentar função antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (BEHBAHANI *et al.*, 2013).

3.5.1 Terpenos

Os terpenos podem ser formados a partir do ácido mevalônico no citoplasma ou do piruvato e 3- fosfoglicerato no cloroplasto. Vários terpenos são utilizados pelo homem devido sua ação inseticida e aromática dos óleos essenciais que procedem dos monoterpenos (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Segundo Otoguro *et al.* (2011) 6 sesquiterpenos, 14 sesquiterpenos lactonas e 4 diterpenos apresentam efeito antitripanosomal contra *Trypanosoma brucei brucei*. Análises mostraram que extratos de folhas e caules de cereja (*Prunus cerasus*) que apresentavam elevada quantidade de terpenos exibem atividade antibacteriana em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Devido a estas propriedades e sua ação antioxidante, apresentam potencialidade para serem adicionados em produtos cosméticos e em embalagens de alimentos (PICCIRILLO *et al.*, 2013). Já Raut *et al.* (2013) verificaram o potencial terapêutico de terpenóides, onde o mesmo atuou como antibiofilme de *Candida albicans*.

3.5.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos provêm do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Apresentam no mínimo um núcleo aromático, podendo conter um ou mais grupo hidroxil livre ou em forma de compostos ésteres, éteres ou hererosídeos (LIMA *et al.*, 2013). São encontrados em plantas comestíveis e não comestíveis, apresentam vários efeitos biológicos, inclusive como antioxidantes. Vegetais ricos em compostos fenólicos atraem o interesse da indústria alimentícia, pois retardam a degradação oxidativa dos lipídeos, melhorando a qualidade e valor nutricional do alimento (KAHKONEN *et al.*, 1999). Os compostos fenólicos presentes nas plantas são representados por flavonóides, saponinas e taninos.

Os flavonóides são compostos com grande distribuição no reino vegetal. Estão presentes em vários órgãos da planta, podendo apresentar diferentes formas estruturais. Constituem um baixo peso molecular, incidindo 15 átomos

de carbono organizados na seguinte estrutura (C6-C3-C6) (FLÓREZ *et al.*, 2002).

As funções biológicas desempenhadas pelos flavonóides depende de sua estrutura química. Atuam potencialmente como antioxidantes, para eliminar os radicais livres e inibir a peroxidação lipídica (BARKU *et al.*, 2013). Apresentam características farmacológicas em diferentes patologias, tais como câncer, diabetes mellitus, doenças cardíacas e úlceras, exibem ação antiviral, antialérgica antiinflamatória e antimicrobianas contra *Bacillus cereus*, *Candida albicans* e *Cladosporium cucumerinum* (MATEJIC *et al.*, 2013), além de serem inibidores de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson, agindo também contra o envelhecimento (FLÓREZ *et al.*, 2002; BARKU *et al.*, 2013; CZAPLINSKA *et al.*, 2012).

Os taninos são compostos polifenólicos de origem vegetal, podem ser classificados como taninos hidrolisáveis que consistem de ésteres de ácidos gálicos e seus produtos de oxidação e taninos condensados que são oligômeros e polímeros de flavan-3-ols (ANDRÉS *et al.*, 2012). São solúveis em água e seu peso molecular corresponde de 500 a 3000 Dalton (MONTEIRO *et al.*, 2005). Apresentam vários efeitos biológicos por serem agentes quelantes de íons metálicos, agentes precipitantes de proteína e antioxidantes (ANDRÉS *et al.*, 2012). Os taninos podem exibir atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (AKIYAMA *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2012), e tem sido muito reconhecido quanto a inibição de herbívoros, pois em elevadas concentrações nos diferentes órgãos da planta tornam-se impalatáveis aos fitófagos (VOLZ *et al.*, 2001).

3.5.3 Alcalóides

Os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), que resultam do ácido chiquímico e aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Possuem um ou mais átomos de nitrogênio em seu esqueleto carbônico, e são reconhecidos por desempenharem atividade biológica. Alcalóides fornecem proteção às plantas contra agentes externos como

herbívoros e fungos (MARAGONI *et al.*, 2012), apresentam potencial larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* (GARCEZ *et al.*, 2013) e ainda atuam na ação antimicrobiana sobre cepas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (CAYUNAO *et al.*, 2004).

3.6 Metabolismo secundário X Microrganismos Patogênicos

Mesmo com os avanços da medicina moderna, doenças infecciosas ainda continuam causando morbidade e mortalidade no mundo, esse fato deve-se principalmente aos mecanismos de resistência adquiridos por microrganismos, devido ao uso abusivo de medicamentos prescritos na medicina humana e veterinária (MELLOR, 2000).

O Brasil exibe uma das maiores biodiversidades do planeta, representadas por aproximadamente cerca de 120.000 espécies vegetais, sendo realizadas somente 10% de pesquisas químicas e biológicas destas espécies (RAMOS *et al.*, 2012).

Uma das mais antigas práticas medicinais exercidas pela humanidade advém do uso empírico de plantas medicinais (LIMA *et al.*, 2013). Os compostos isolados de vegetais exibem estruturas químicas que geralmente apresentam grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos utilizados no tratamento contra microrganismos patogênicos (SING *et al.*, 1984), como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.

A resistência a antimicrobianos envolvem fenômenos genéticos, capazes de codificarem diferentes mecanismos bioquímicos, que inativam a ação das drogas (TAVARES *et al.*, 2000). Diante disso torna-se de fundamental importância a busca por novos compostos e/ou agentes de modo a combater e/ou controlar estes microrganismos.

3.7 Metabolismo secundário de *Crambe abyssinica*

As plantas pertencentes a família Brassicaceae apresentam glucosinolatos que são uma importante classe de metabólitos secundários (RAMPAL *et al.*, 2012). Os glucosinolatos (β -thioglucoside-N-hydroxysulphates) desempenham distintas propriedades biológicas, sendo elas antimicrobiana, antifúngica, nematocida, antiprotozoária, inseticidas e anticâncer (MOHAMED *et al.*, 2009; ABDELSHAFEEK *et al.*, 2011).

São ânions orgânicos que consistem em α -D-thioglucose, grupo ligado a uma porção de aldoxima sulfonado e de um aminoácido de cadeia lateral derivada de R-grupo. De acordo com sua estrutura podem ser alifáticos, aromáticos methylthioalkyl e heterocíclico. A hidrólise dos glucosinolatos por enzimas mirosinase consiste em diferentes compostos sendo eles isotiocianatos (ITC), tiocianatos, nitrilos e oxazolidinonas (RAMPAL *et al.*, 2012).

Os ácidos graxos provenientes de *Crambe abyssinica*, podem ser utilizados na indústria farmacêutica e cosmética (NSIBANDE, 2013). Seu óleo contém ácidos graxos como Palmítico, Esteárico, Oléico, Linoléico, Linolênico, Eicosanóico, Erússico, Brassídico, Tetracosanóico, Nervônico entre outros (SPRINGDALE, 2005). A composição das plantas pode alterar devido a fatores genéticos, ambientais e as condições de processamento pós-colheita (ESMAEILI *et al.*, 2013).

O óleo de *Crambe* pode apresentar elevado teor de ácido oléico, linoléico e linolênico. Esses são responsáveis por ações antibacterianas o que também é visto em menor atividade no ácido palmítico e esteárico (ZHENG *et al.*, 2005).

3.8 Análise fitoquímica

A pesquisa fitoquímica tem como finalidade determinar a presença de constituintes químicos de espécies vegetais, podendo também identificar grupos metabólitos secundários (SIMÕES *et al.*, 2002). Para isso é necessário

o uso de técnicas como a Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada à Espectroscopia de Massas (CGAR-MS) e a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (FARIA *et al.*, 2007).

A cromatografia apresenta melhor desempenho e é uma das técnicas mais utilizadas entre as ferramentas analíticas (CHIARADIA *et al.*, 2008). Enquanto que a espectrometria de massas (MS) fornece informações quanto à identificação de compostos orgânicos, elucidação estrutural e quantificação. A junção dessas duas ferramentas possibilita maior especificidade em análises de misturas complexas (DE GRANDE *et al.*, 1990).

Outra técnica utilizada é a RMN que gera informações estruturais e dinâmicas sobre a matéria, a qual é fundamentada na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos (LUZYANIN *et al.*, 2010).

Estudos preliminares dos constituintes químicos presentes em plantas permite o conhecimento dos extratos e indica a natureza das substâncias, o que facilita na escolha de técnicas de fracionamento cromatográfico a serem realizadas. Através de testes analíticos padrões, os principais compostos que podem ser observados são os ácidos graxos, terpenóides, esteróides, fenóis, alcalóides, cumarinas e flavonóides (MACIEL *et al.*, 2002).

3.8.1 Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) é uma técnica usada para identificação de compostos voláteis, e tem uma ampla área de aplicação. Segundo Siqueira *et al.* (2007) essa ferramenta mostra viabilidade para monitorar a composição de extratos, avaliar alterações químicas e comparar extratos oriundos de diferentes coletas.

Santos *et al.* (2010) verificaram a potencialidade da CG-MS para identificação de compostos presentes no óleo essencial de *Piper amalago*.

Campos *et al.* (2005) observaram que essa ferramenta cumpre com os princípios de confiança necessários para a detecção de esteróides androgênicos anabólicos em amostras de urina, contribuindo no exame antidoping nos esportes.

Silva *et al.* (2013), analisaram *Euterpe oleracea* através da cromatografia gasosa, a qual indicou a presença de ácidos graxos como palmítico (20,4%), palmitoléico (3,4%), esteárico (1,3%), oléico (63,9%), linoléico (10,3%), linolênico (0,5%) e araquídico (0,05%).

3.8.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica utilizada na separação, identificação e quantificação de compostos orgânicos. Acoplada ao detector de arranjo de diodos (DAD), pode fornecer informações estruturais de substâncias presentes em extrato bruto de plantas. Quando conectado ao espectrômetro de massas (CLAE-MS) auxilia na identificação de compostos orgânicos (Yang *et al.*, 2011). Como exemplo podemos citar um estudo realizado por Queralt *et al.* (2011), analisando os compostos fenólicos do Ketchup, Gaspacho e suco de tomate através de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, esses autores verificaram a presença de 47 compostos fenólicos e observaram a diferença da composição fenólica entre os produtos a base de tomate, estando este fato principalmente relacionado ao alho, cebola e pimentão adicionados em sua produção.

3.8.3 Ressonância Magnética Nuclear

A espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear consiste na absorção de energia na gama das radiofrequências de núcleos contidos numa molécula, através de um intenso campo magnético. Pode ser utilizada em análises de fármacos, polímeros e substâncias desconhecidas (ALVES, 2010). É considerada uma das técnicas mais importantes para análise qualitativa de princípios ativos (SANTOS *et al.*, 2013).

Como exemplo da utilização desta técnica podemos citar estudos realizados por Carvalho *et al.* (2010). Neste avaliaram a presença de

diterpenos clerodânicos de extratos pertencentes a diferentes órgãos de *C. sylvestris*, utilizando a cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e RMN de ^1H . Essa ferramenta também vem sendo empregada para identificação e classificação do mel de diferentes fontes florais e origens geográficas (SCHIEVANO *et al.*, 2010).

A RMN apresenta vantagens como rápida informação dos componentes químicos presentes em vários alimentos e bebidas. Embora exiba menos sensibilidade do que as outras técnicas apresentadas, quando combinada com análise multivariada dos dados, torna-se precisa para a observação de um processo dinâmico, incluindo as alterações na composição dos alimentos (WEI *et al.*, 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas no Setor de Nutrição de Ruminantes da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados (FCA/UFGD) entre os meses de abril a agosto de 2013. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Saúde (FCS/UFGD) entre os meses de abril a outubro de 2013.

Os grãos de *Crambe abyssinica* foram cedidos pela Fundação MS, e identificados pelo Laboratório de Sementes da Universidade Federal da Grande Dourados.

As etapas de fracionamento do extrato etanólico, determinação de alcalóides na fração hidroalcoólica, triagem fitoquímica, análise do extrato etnólico e demais frações via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram conduzidos no Laboratório CPBio da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul/Dourados/MS.

As análises da fração hexânica via Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas foi executada no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS/RS).

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi desenvolvida no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR/PR).

4.1 Procedimento experimental

Foi coletado aproximadamente 250 mL de líquido ruminal através de fistulas, injetando continuamente CO₂. O animal fistulado encontra-se na figura 1.



Figura 1: Bovino submetido à avaliação de dietas através de coleta em fistula de borracha KHEL.

O líquido ruminal foi filtrado em tecido de gaze de algodão duplo e distribuído 25 mL em frascos que continham 100 mg de rações previamente pesadas, com exceção do tratamento 6 (controle apenas líquido ruminal) (CAMPOS *et al.*, 2000). Os tratamentos foram identificados como T1 (controle ausência de crambe), T2 (substituição de 2,5% do farelo de soja), T3 (substituição de 5% do farelo de soja), T4 (substituição de 10% do farelo de soja), T5 (substituição de 15% do farelo de soja) e T6 (controle apenas líquido ruminal, ausência de torta de crambe).

Aos frascos foi imediatamente adicionado 100 mL de saliva artificial, e realizada a primeira medição de pH nos diferentes tratamentos com injeção contínua de CO₂. Após foram lacrados e colocados em banho-maria a 39°C para manutenção da temperatura e da microbiota ruminal. Os tratamentos ficaram incubados no banho-maria nos tempos: 30, 60, 120 e 240 minutos. Ao término de cada tempo o pH foi aferido (CAMPOS *et al.*, 2000 b). O valor do pH correspondeu à média de três repetições. Posteriormente uma curva de pH foi estabelecida com esses valores.

Em seguida foram realizados os procedimentos para isolamento dos microrganismos ruminais, contagem padrão em placas (CPP) total de microrganismos mesófilos anaeróbios, contagem de fungos filamentosos e leveduras em condições de anaerobiose.

Para (CPP) de microrganismos totais as amostras foram diluídas (Russel, 2002) e inoculadas em quadruplicata em Ágar Sangue de carneiro (CALDWELL *et al.*, 1966) acrescido de 1% de líquido ruminal esterilizado (RASHID *et al.*, 2008). As placas foram incubadas em anaerobiose a 37°C/24 horas.

Para a contagem de fungos e leveduras foi realizado plaqueamento em duplicata em Ágar Saboraud acrescido de 1% de líquido ruminal esterilizado e antibiótico Enrofloxacina, a inoculação foi realizada em duplicata. As placas foram incubadas em anaerobiose a temperatura ambiente por sete dias.

Para o isolamento das colônias foi adicionado 3 mL de líquido ruminal esterilizado e 1mL da amostra em cada tubo contendo 9 mL de caldo BHI. Em seguida foram incubados a 37°C/24 horas e estriados em Ágar Sangue acrescido de 1% de líquido ruminal esterilizado para o isolamento. Após seleção as cepas foram repicadas e armazenadas em caldo BHI com 15% de glicerol em temperatura (-20 °C).

4.2 Preparo do extrato etanólico de *Crambe abyssinica* e partições líquido-líquido

Os grãos foram pulverizados em moinho do tipo willey, obtendo-se um total de 300g que foram submetidos a 4 extrações por maceração com etanol (92,80%). Foi obtido um total de 23g de extrato, sendo que o rendimento do extrato etanólico foi de 7,67 %.

O extrato etanólico foi dissolvido em metanol/água 8/2 (80 mL de metanol e 20 mL de água). A solução foi transferida para um funil de separação, onde foi realizada a extração líquido-líquido com hexano (3 x 35 mL), clorofórmio (3 x 35 mL), acetato de etila (3 x 35 mL), resultando nas frações hexânica (6,4g), clorofórmica (2,0g), acetato de etila (0,5g) e hidroalcoólica (10,15g). Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador (marca Quimis modelo MA680). A fração hidroalcoólica foi ressuspendida em água e liofilizada em liofilizador Torroni®. Os solventes

utilizados na extração para análise são (P.A). A figura 2 mostra os procedimentos para o preparo do extrato etanólico e partições líquido-líquido de grãos de *Crambe abyssinica*.

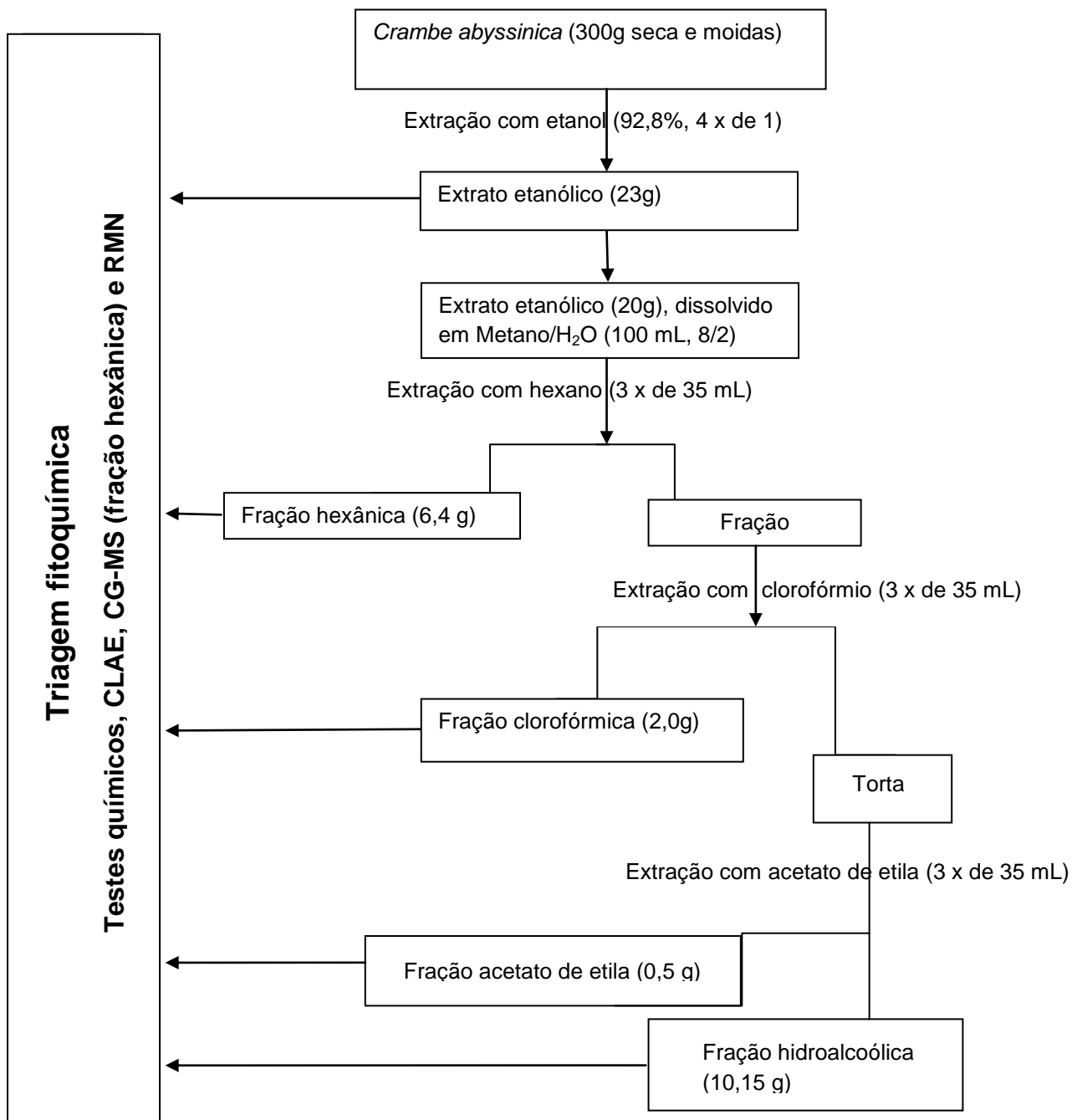


Figura 2: Fluxograma correspondente às partições líquido-líquido do extrato etanólico de grãos de *Crambe abyssinica*.

4.3 Triagem Fitoquímica

Para determinar o potencial farmacológico antimicrobiano do extrato etanólico e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica dos grãos de *Crambe abyssinica* foi realizado o fracionamento de triagem fitoquímica para rastrear as seguintes classes de substâncias: alcalóides (WALL *et al.*, 1954; COSTA, 1982), esteróides e triterpenóides (WALL *et al.*, 1954), flavonóides (WALL *et al.*, 1954), ácidos orgânicos (MERCK, 1980), fenóis e taninos. O preparo dos reagentes e procedimentos está descrito no apêndice E.

4.4 Análise do Extrato Hexânico via Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas

Buscando a identificação e quantificação de compostos em misturas as análises de CG-MS foram realizadas em cromatógrafo a gás (GC-17A), equipado com detector de massas Ion Trap (QP 5050), utilizando coluna DB-5 (5% de fenil-dimetilpolisiloxano), coluna de sílica fundida (30 mx 0,25 mm, 0,25 mm de espessura), sob as seguintes condições: gás de arraste hélio (fluxo de 1,0 ml / mim), 1 mL volume de injeção, taxa de divisão (1:20), com a temperatura do forno inicial de 50°C e aquecimento de 50°C - 280 ° C a 10°C / min. A temperatura do injetor, detector e linha de transferência foi de 280 °C. Para o espectrômetro de massas foi empregada a energia de ionização de 70 Ev, com intervalo de massas de 45-800 m/z e um intervalo de varredura de 0.5s.

4.5 Análise dos Extratos via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com a finalidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras com eficiência e sensibilidade em pequena escala de tempo, os extratos foram analisados no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE), (modelo: VARIAN 210), detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. Coluna (Phenomenex ®) C-18 (Ø 4,6 mm x || 250 mm, diâmetro da partícula 10 µm) e pré-coluna (25 mm x 3 mm) de mesma fase da coluna. Eluição realizada em sistema gradiente: MeOH/H₂O de 5 a 100% metanol, levando 15 minutos para atingir 100% de metanol, 100% de metanol por 5 minutos e 5 minutos para voltar à condição inicial. Tempo de análise foi de 25 min. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado de 5 µL. As amostras foram filtradas com um micro-filtro de 0,45 µm.

4.6 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para gerar informações estruturais e dinâmicas sobre a matéria, a qual se fundamenta na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos, foi utilizado um espectrômetro da BRUKER AC 400 operando a 400 MHz ¹H e 100 MHz para o ¹³C. Para as análises, as amostras do extrato etanólico e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila foram dissolvidos em CDCl₃ (clorofórmio), o extrato etanólico foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO).

4.7 Fracionamentos da fração hidroalcoólica para determinação de alcalóides.

Este fracionamento foi realizado com o objetivo de separar os alcalóides dos açúcares. Normalmente os açúcares saem nas primeiras frações no sistema utilizado.

O extrato hidroalcoólico foi fracionado em uma coluna de C18 Ø 15/4 cm

de comprimento, onde foi eluído em quatro frações (1º MeOH 10% H₂O 90%, 2º MeOH 30% H₂O 70%, 3º MeOH 70% H₂O 30% e 4º MeOH 100%) de 15 mL cada.

4.8 Testes de atividade antimicrobiana

Para os testes de atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações hexânica e hidroalcoólica foram utilizadas as técnicas de difusão em disco em Ágar Muller Hinton frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 1706, *Candida albicans* (SANTIAGO *et al.*, 2010) e CIM frente as seguintes espécies: *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumonia* ATCC 1706, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275, *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 e microrganismos isolados do rúmen.

Os inóculos de bactérias e leveduras foram preparados a uma concentração de 2×10^8 UFC/mL, a partir de suspensão a 0,5 McFarland, obtidas de culturas recentes de microrganismos teste (CLSI, 2012). Para a obtenção do inóculo de fungos filamentosos, os mesmos foram inseridos em salina esterilizada para homogeneização.

4.8.1 Difusão em Disco

Para triagem do potencial farmacológico do extrato etanólico e das frações hexânica e hidroalcoólica, foram utilizados discos embebido com 20µL de uma solução a 50mg/mL (DMSO 10%). As placas foram incubadas a 37°C/24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas 3 repetições. O controle positivo foi o antibiótico (GENTAMICINA) e controle negativo (DMSO 10%) (KARAMAN *et al.*, 2003). As cepas utilizadas foram *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *C. albicans*.

4.8.2 Concentração Inibitória Mínima

Os ensaios de sensibilidade de microdiluição em caldo foram aplicados para avaliar o potencial antimicrobiano do extrato etanólico e das frações hexânica, acetato de etila, clorofórmica e hidroalcoólica (ZOGDA *et al.*, 2001). Os mesmos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO 10%) (KARAMAN *et al.*, 2003). A concentração inicial foi de 0,048 a 25 mg/mL frente aos microrganismos teste.

A CIM do ácido palmítico puro foi realizada para verificar se a atividade antifúngica da fração hexânica estava relacionada à sua presença. O ácido palmítico foi dissolvido em etanol 10% (DILIKA *et al.*, 2000). Com concentrações iniciais de 0,0018 a 1mg/mL, sobre as cepas ATCCs e microrganismos isolados do rúmen.

Para a análise da atividade antimicrobiana de alcalóides provenientes da fração hidroalcoólica sobre *S. aureus* e *C. albicans* foi empregada concentração inicial de 0,0039 a 2 mg/mL.

4.9 Análise Estatística

O experimento foi realizado em fatorial de 6x5x3x2 (6 tratamentos, 5 tempos, 3 repetições, 2 tipos de grupos microbianos CPP de microrganismos mesófilos anaeróbios totais e contagem de fungos filamentosos e leveduras para a quantificação da microbiota ruminal). Os resultados foram expressos na forma de gráficos e tabelas, a análise estatística referente aos dados foram realizadas através do pacote estatístico SAEG 9.1 (UFV, 2007), as médias foram comparadas através do teste de Tukey com 5% de probabilidade ($P>0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No apêndice C estão apresentados os resultados dos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidratos não fibrosos (CNF), os mesmos revelaram-se mais elevados nos T1, T3 e T2 respectivamente.

Observaram-se menores quantidades de FDN nos Tratamentos 2, 4 e 5 apresentando os respectivos valores (36,05), (37,95) e (40,45). Esses resultados também foram verificados em FDA que exibiram (5,87), (6,47) e (6,70), respectivamente. Já os CNF referentes aos mesmos tratamentos corresponderam aos valores mais elevados (54,28), (52,07) e (48,11), respectivamente. De acordo com Russell *et al.* (1992), o pH do rúmen pode diminuir em decorrência da restrição da quantidade de fibra e aumento de carboidratos rapidamente fermentáveis. Para Simões *et al.* (2008), o pH pode variar em decorrência do tipo de alimento e intervalo de tempo.

Conforme descrito por Souza *et al.* (2009), o *Crambe abyssinica* contém elevado teor de lipídios em seus grãos. Segundo Messana *et al.* (2013), elevados teores de lipídios podem ser incluídos na dieta de animais em produção, complementando a elevada exigência de energia. Porém, lipídios insaturados ministrados em doses excessivas podem causar a queda do pH no ambiente ruminal, conseqüentemente provocando toxicidade frente às bactérias Gram-positivas no rúmen, afetando principalmente a população celulolítica.

Ao analisar a figura 3 e 4, é possível observar que não houve diferença significativa do pH inicial e final correspondentes ao mesmo tratamento após a cinética, devido à adição da saliva artificial ao líquido ruminal.

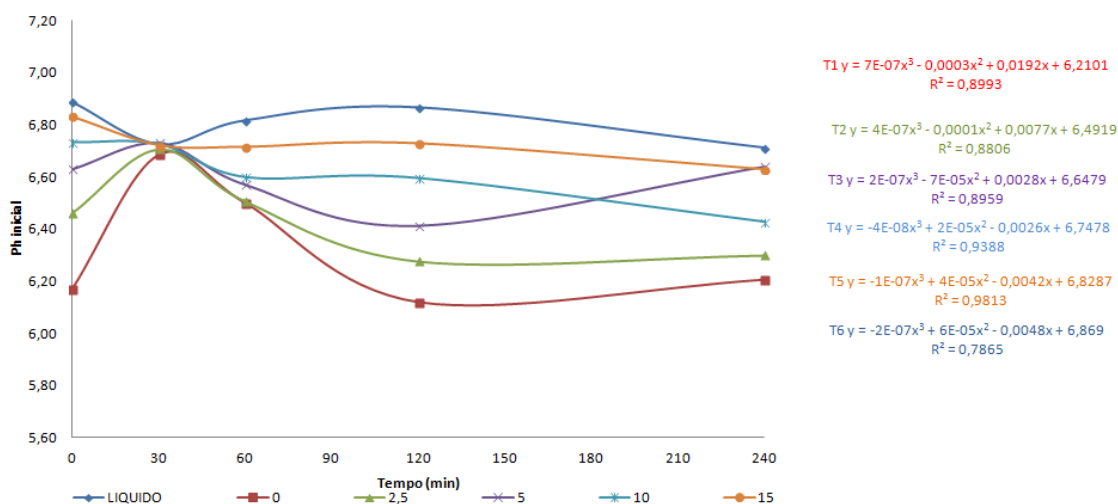


Figura 3: pH inicial dos tratamentos correspondentes aos tempos de 0, 30, 60,120 e 240 minutos.

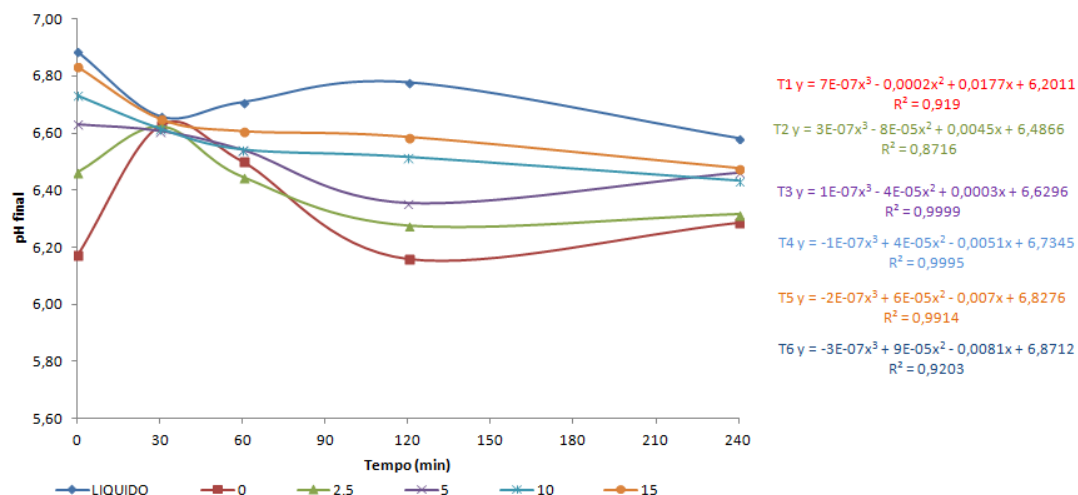


Figura 4: pH final dos tratamentos correspondentes aos tempos de 0, 30, 60,120 e 240 minutos.

A manutenção do pH é considerada muito importante para a estabilidade e persistência da microbiota intestinal (FRANZOLIN *et al.*, 2010). O pH mais frequentemente encontrado no ambiente ruminal varia de 6,8 a 6,9 e a saliva atua como substância tampão, contribuindo desta maneira para a manutenção de um pH estável (RUIZ, 1992; ANDRIGUETTO *et al.*, 2002).

Pode-se observar que o T1 encontra-se com o pH mais baixo (6,12), e T6 pH mais elevado (6,89). Já nos tratamentos 2 (6,46),3 (6,63), 4 (6,73) e 5

(6,83), nota-se o aumento crescente do pH em decorrência do acréscimo das concentrações de torta de Crambe no tempo de 0 minutos.

Conforme observado, nos primeiros 120 minutos houve decréscimo do pH nos tratamentos 1, 2, 3, 4 e 5 (figura 4) e aumento de nitrogênio, o qual é visualizado com menor intensidade no período de 4 horas (figura 5). A queda do pH no tempo de 120 minutos pode estar associada a fermentação de proteínas por microrganismos que liberam amônia, aumentando sua acidez .

Os valores do pH influenciam na degradação da fração fibrosa, pois quando atinge 5,5 ou 5,0, o crescimento de bactérias celulolíticas e a digestão da fibra podem ser inibidos, pois as bactérias celulolíticas são sensíveis ao pH ácido (FONSECA *et al.*, 2001). O que não foi visualizado neste trabalho, uma vez que o nível de pH mais baixo foi 6,16 representado no T1. O pH considerado ótimo para o crescimento dessas bactérias situa-se entre 6,3 e 6,8. As bactérias amilolíticas, por sua vez, são resistentes à acidez e sua maior faixa de crescimento é representada por variações de pH entre 5,5 e 6,6 (HIGUERA, 2012).

A queda do pH ruminal está relacionada ao acúmulo de ácido láctico, aumentando a presença de *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus* sp. tolerantes ao pH baixo (MOREIRA *et al.*, 2009). Esses microrganismos podem estar presentes no T1, onde o crescimento em pH baixo foi elevado no tempo de 120 minutos.

Quando há deficiência de carboidratos, os microrganismos fermentam os aminoácidos que são desaminados, originando a produção de amônia (BARBOSA *et al.*, 2004). Os aminoácidos liberados e a amônia produzida são empregados na síntese de proteína microbiana (NETO *et al.*, 2008). O balanço de nitrogênio amoniacal tem como finalidade avaliar o nitrogênio utilizado pelos microrganismos no rúmen (LIMA, 2011).

As concentrações crescentes de torta de Crambe apresentaram efeito entre o pH e a concentração de nitrogênio amoniacal ruminal (figuras 4 e 5).

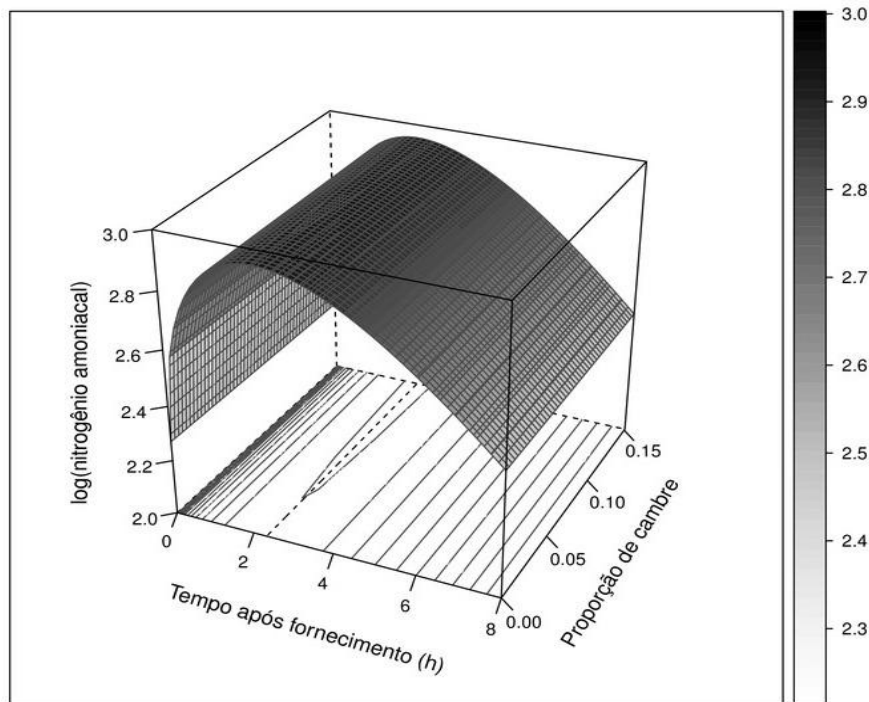


Figura 5: Concentração de Nitrogênio Amoniacal do líquido ruminal de bovinos em relação aos tratamentos em diferentes tempos de coletas.

Houve um aumento de nitrogênio amoniacal no tempo de 2 horas, apresentando menor intensidade no período de 4 horas. Esta redução na concentração de $N-NH_3$ ruminal está ligada ao aumento da disponibilidade de energia para a síntese de proteína microbiana (FRANÇA *et al.*, 2012). Resultado similar foi encontrado por Dias *et al.* (2000), que ao analisar o $N-NH_3$ ruminal em períodos de 2, 4, 6, e 8 horas após fornecimento da ração que continha cana-de açúcar suplementada com uréia, glúten de milho e farelo de soja, encontraram maior produção de amônia no período de 2,92 horas após o consumo.

Os microrganismos que fermentam carboidratos estruturais (CE) celulose e hemicelulose apresentam um lento crescimento utilizando a amônia como fonte de N para a síntese de proteína microbiana. Já os microrganismos que fermentam carboidratos não estruturais (CNE) amido, pectina e açúcares, exibem um crescimento mais rápido, e utilizam amônia, peptídeos e aminoácidos como fonte de N (LADEIRA *et al.*, 1999). Sendo possível a

presença desses microrganismos nas diferentes curvas de nitrogênio amoniacal.

A figura 6 mostra a (CPP) de microrganismos totais do rúmen em função dos diferentes tratamentos e intervalo de tempo.

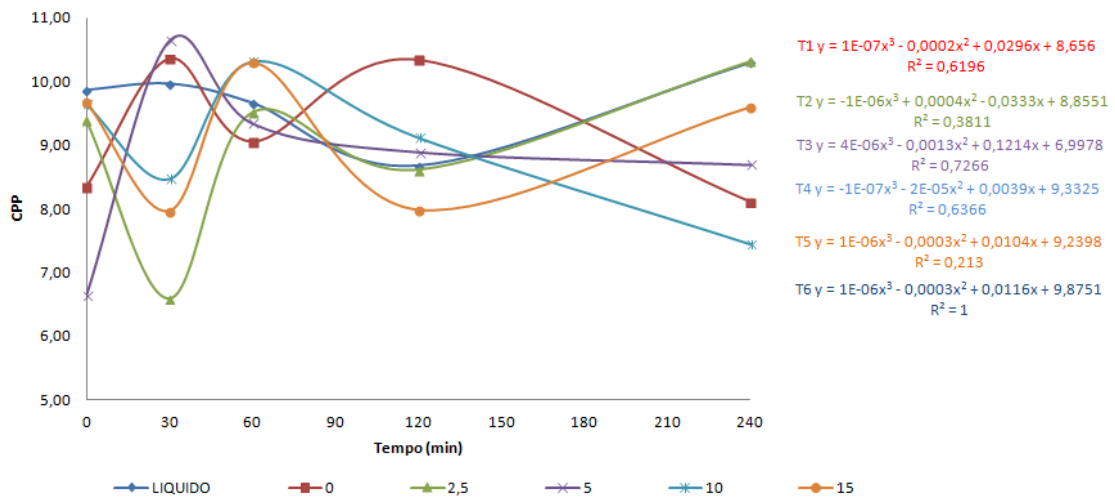


Figura 6: Contagem Padrão em Placa (CPP) total de microrganismos do rúmen, em função dos diferentes tratamentos e intervalo de tempo de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos.

Analisando os resultados obtidos, foi possível observar o mesmo comportamento da cinética no crescimento microbiano nos tratamentos 2 (9,38; 6,59; 9,51; 8,61; 10,31), 5 (9,69; 7,96; 10,30; 7,98; 9,60) e 4 (9,65; 8,47; 10,32; 9,12; 7,45) este último diferenciando-se apenas em 240 minutos. Os tratamentos 3 (6,64; 10,64; 9,34; 8,89; 8,69) e 6 (9,87; 9,97; 9,67; 8,68; 10,30) diferiram apenas em 240 minutos, e o T1 (8,34; 10,36; 9,06; 10,34; 8,11) apresentou diferença quando comparado aos dois tratamentos anteriores no tempo de 120 minutos.

As taxas de crescimento da (CPP) diminuíram com o decréscimo do pH no tempo de 120 minutos, com exceção do T1 (figura 6). Nagajara *et al.* (1992) também relacionaram a redução do crescimento de microrganismos ruminais de bovinos à queda do pH.

O mesmo é demonstrado no crescimento de fungos filamentosos e leveduras (figura 7), correspondente aos tratamentos 2 (2,88; 3,06; 2,91; 2,84; 2,78), 4 (2,93; 2,67; 3,02; 2,82; 2,88) e 6 (2,95; 2,67; 3,09; 3,03; 2,80).

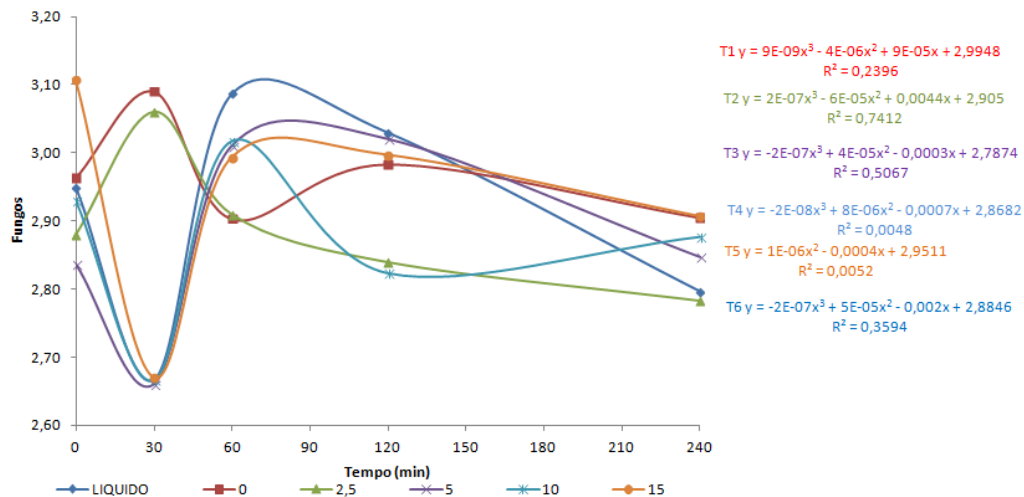


Figura 7: Contagem de fungos filamentosos e leveduras em função das diferentes concentrações de torta de *Crambe abyssinica* e do tempo de 0, 30, 60, 120 e 240 minutos.

Os tratamentos 1 (2,96; 3,09; 2,90; 2,98; 2,91) e 2 (2,88; 3,06; 2,91; 2,84; 2,78) apresentaram similaridade diferindo-se apenas no tempo de 120 minutos. Os tratamentos 3 (2,84; 2,66; 3,01; 3,02; 2,85) e 5 (3,11; 2,67; 2,99; 3,00; 2,91) tiveram o mesmo comportamento de crescimento em relação a cinética. Os tratamentos 4 (2,93; 2,67; 3,02; 2,82; 2,88) e 6 (2,95; 2,67; 3,09; 3,03; 2,80) também exibiram similaridade, diferindo apenas no tempo de 120 minutos.

Abrão *et al.* (2010), verificaram que dietas ricas em fibras estimulam o crescimento de fungos. De acordo com Daubos *et al.* (1998) a torta de Crambe pode conter 27% de fibras, o que pode explicar o elevado crescimento de fungos nos tratamentos com inclusões de torta de Crambe. A microbiota de fungos filamentosos e leveduras correspondentes ao T6 também apresentaram um elevado crescimento, o qual pode estar associado à fibra disponível em pastagens consumida pelo animal.

Em bovinos a principal espécie de fungos presentes na microbiota ruminal é *Neocallimastix variabilis* (ciclo monocêntrico) e *Anaeromyces elegans* (ciclo policêntrico) (ABRÃO *et al.*, 2010). Estudo realizado por esses autores relevaram a maior presença do *Neocallimastix* no líquido ruminal, devido sua maior atividade.

Na figura 8 observa-se que as concentrações da torta de Crambe proporcionam crescimento da microbiota ruminal total, com exceção dos tratamentos 2 e 5.

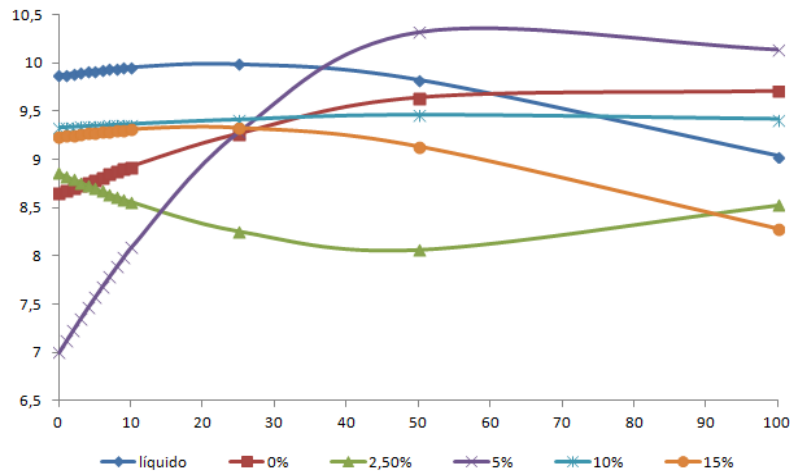


Figura 8: Simulação da equação da reta referente às concentrações de torta de Crambe e o crescimento microbiano (CPP).

O declínio do crescimento microbiano no T2 pode estar relacionado à adaptação desses microrganismos, já que esse tratamento continha menor inclusão de torta de *Crambe abyssinica*. A queda do crescimento desses microrganismos em relação ao T5 direciona-se ao fator de toxicidade. Essa toxicidade está ligada a presença de glucosinolatos (TRIPATHI, 2007) e a elevados teores de lipídios presentes nos grãos de Crambe (SOUZA *et al.*, 2009). Messana *et al.* (2013), observaram que os lipídios podem ocasionar a eliminação de bactérias Gram-positivas, principalmente prejudicando o crescimento de microrganismos celulolíticos no rúmen de bovinos.

5.1 Triagem fitoquímica

A tabela 1 mostra os resultados obtidos da triagem fitoquímica, sendo possível inferir que o extrato etanólico e as frações clorofórmica e hidroalcoólica possuem elevada presença de alcaloides e leve presença de

esteróides e triterpenos em todas as frações. A presença de alcalóides pode estar associada à glucosinolatos e isotiocianatos que possuem nitrogênio em sua estrutura (KUCHEMIG *et al.*, 2012). Os glucosinolatos são derivados da biossíntese de aminoácidos e sua concentração pode ser modificada nos diferentes grupos dessa família (JAHANGIR *et al.*, 2009).

Tabela 1: Resultados da triagem fitoquímica com reagentes

	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração Clorofórmica	Fração acetato de etila	Fração hidro alcoólica
Alcalóide (reagente dragendorf)	+++	-	+++	-	+++
Alcalóide (reagente de Mayer)	+	-	++	-	+++
Alcalóide (reagente de Bouchardat)	+++	-	+++	-	+++
Ácidos orgânico (reagente de pasková)	-	-	-	-	-
Fenóis e Taninos	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	-	-
Esteróides e triterpenos	+	+	+	+	+

+++ presença grande, ++ presença notável, + presença leve, -ausência

5.2 Análise da fração hexânica via CG-MS

Foram identificados os compostos, ácido palmítico (4,07 %), ácido oléico (40,32 %), ácido linoléico (2,64%), ácido linolênico (7,10%) e ácido erúxico

(23,10%). O óleo de *Crambe abyssinica* contém ácidos graxos como Palmítico, Esteárico, Oléico, Linoléico, Linolênico, Eicosanóico, Erússico, Brassídico, Tetracosanóico, Nervônico entre outros (SPRINGDALE, 2005). Porém sua composição pode alterar devido a fatores genéticos, ambientais, e condições de processamento pós-colheita (ESMAEILI *et al.*, 2013).

Os resultados da CG-MS observados neste trabalho estão condizentes com o descrito por Vinni *et al.* (1996), onde afirmam que a diminuição nos teores de ácido erúccico corresponde a um aumento de ácido oléico em plantas pertencentes a família Crucífera. Segundo os autores os ácidos graxos saturados que ocorrem com maior frequência na natureza são os ácidos butírico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico e behênico. Os ácidos graxos insaturados são representados por oléico, linoléico, linolênico, araquidônico e erúccico. No óleo de *Crambe* em estudo observou-se a maioria dos ácidos graxos insaturados e apenas o ácido palmítico como insaturado.

5.3 Análise via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O cromatograma para a fração hexânica apresenta apenas dois sinais de baixa intensidade. As frações clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica são muito semelhantes, pois exibem os mesmos sinais no cromatograma (apêndice F).

Lazzeri *et al.* (1994) através de análises de Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), identificaram uma elevada presença de glucosinolatos nos grãos de *Crambe abyssinica*.

A baixa intensidade na fração hexânica possivelmente está vinculado à ausência de compostos que estão presentes nas demais frações. Esses compostos não correspondem aos alcalóides, já que não foram encontrados na fração acetato de etila (fração que apresenta semelhança com as demais). Havendo necessidade de novos estudos que levem a descoberta dos demais constituintes químicos.

5.4 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN (apêndice G) indicam semelhança entre o extrato etanólico e fração hexânica, tendo como componente majoritário o ácido oléico. As frações acetato de etila e clorofórmica também são semelhantes, mas os testes químicos apontam que a fração clorofórmica possui alcalóide, o que não foi verificado na fração acetato. Os Espectros de RMN na fração hidroalcoólica evidenciam a presença de açúcares e os testes químicos revelam para esta fração a presença de alcalóides. Costa (2012 b), relatou que espectros de RMN confirmam a presença de ácidos graxos monoinsaturados em extratos da semente de colza, também pertencente a família das Brassicáceas.

Em resumo, o extrato etanólico apresenta alcalóides, açúcares, ácidos graxos, esteróides e triterpenos. Na fração hexânica ácidos graxos, esteróides e triterpenos. A fração clorofórmica contém alcalóides, esteróides e triterpenos. A fração acetato de etila possui esteróides e triterpenos. A fração hidroalcoólica compreende açúcares e alcalóides.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Na tabela 2 estão os resultados da triagem para avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações hidroalcoólica e hexânica, através de testes difusão em disco frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 e *Candida albicans* ATCC 90028.

Tabela 2- Resultados da difusão em disco do extrato etanólico, e frações hexânica e hidroalcoólica de grãos de *Crambe abyssinica*.

Fração	<i>S. aureus</i> ATCC 27664	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 1706	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
Extrato etanólico	R	7mm	R	5mm
Fração hidroalcoólica	7mm	R	R	7mm
Fração hexânica	R	R	R	R

Controle positivo utilizado (Gentamicina). Em *S.aureus* o halo de inibição foi de 7 mm na fração hidroalcoólica, *E.coli* 13 mm extrato etanolica . Em cepas de *C. albicans*, o controle positivo foi fluconazol 25 mg/ ml , representando halo de inibição de 8 mm no extrato etanolico e 9mm fração hidroalcoólica. R=resistência de microrganismos ao extrato e frações em estudo. O extrato etanolico formou halos de 7mm em *E. coli* e em *C.albicans* 5 mm. A fração hidroalcoólica exibiu halo de inibição em *S. aureus* 7mm e *C. albicans* 7 mm.

Observou-se atividade antimicrobiana a partir da técnica de difusão em disco no extrato etanólico sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 90028, exibindo halos de 7 e 5 mm respectivamente, o que pode estar associado a atuação de alcalóides, ácidos graxos, esteróides e triterpenos. A fração hidroalcoólica inibiu *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 (halo de 7 mm) e *Candida albicans* ATCC 90028 (halo de 7 mm), direcionando este resultado à presença de alcalóides. Martins *et al.* (2012) buscando avaliar a atividade antibacteriana de extratos de *Brassica oleracea* var. *Capitata*, obtido por decocção verificaram atividade sobre *Staphylococcus aureus*, exibindo halos de inibição de 9mm.

As Brassicáceas apresentam elevada quantidade de compostos contendo enxofre (MEDEIROS *et al.*, 2010). Os compostos voláteis de enxofre mostram atividade antimicrobiana em fungos (KIUNG, 2011). O aumento de enxofre corresponde à elevação na concentração de glucosinolatos (FALK *et al.*, 2007).

Glucosinolatos de *Brassica nigra* exibem potencial para serem aplicados na indústria contra adesão e formação de biofilmes atuando como agentes antimicrobianos (JAHANGIR *et al.*, 2009).

Koenraad *et al.* (2001), buscavam avaliar o efeito antimicrobiano de extratos da folha de *Arabidopsis* e verificaram que as concentrações de isotiocianato correspondente a 4-methylsulphinylbutyl dessas folhas eram responsáveis por inibir até 50% do crescimento de vários microrganismos incluindo *Fusarium oxysporum* e *Escherichia coli*.

Aires (2009) avaliou o potencial antibacteriano de diferentes glucosinolatos e respectivos hidrolisados sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizando o método de difusão em disco, e constatou que somente os hidrolisados obtiveram potencial antibacteriano, apontando os isotiocianatos como os mais eficientes.

Plantas da família Brassicácea podem apresentar isotiocianatos que desempenham um elevado potencial antimicrobiano sobre *Mycobacterium phlei*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Enterobacter cloacae* conforme verificado em *Eucaria pinnata* (ABDELSHAFEEK *et al.*, 2011).

Janjua *et al.* (2013), através de análises fitoquímicas em extratos *Raphanus sativus* L.var Níger, observaram a presença de taninos, saponinas, flavonóides, phobatannins, antraquinonas, carboidratos, açúcares redutores, esteróides, fitoesterol, alcalóides, aminoácidos, terpenóides, glicosídeos e chalconas. Ressaltando ainda o potencial antimicrobiano de extratos etanol, metanol, acetato de etila e aquoso através da técnica difusão em disco, exibindo halo de inibição contra bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 12598, *Bacillus subtilis*-QAU, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 e bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC-8739, *Salmonella typhi* - ATCC 1479, *Klebsiella pneumonia*-QAU, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7700, *Bordetella bronchiseptica* e *Enterobacter aerogenes* QAU. As concentrações utilizadas pelos autores foram de 50-100 mg/ mL.

Nesse estudo a concentração empregada foi de 50 mg/mL, ocorrendo atividade antimicrobiana somente no extrato etanólico e fração hidroalcoólica,

não havendo mesma resposta na fração hexânica, o que talvez esteja relacionado a ausência de alcalóides e a concentração de 50 mg/mL que pode ter sido insuficiente para a inibição de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida albicans* nessa fração. Razavie *et al.* (2009) também não observaram atividade antimicrobiana dessa fração nos extratos da folha de *Crambe orientalis* frente a cepas *Bacillus subtilis* (PTCC 1207), *Bacillus cereus* (PTCC 1247), *Epiderrnidis aureus* (PTCC 1114), *Escherichia coli* (PTCC 1047), *Candida kefyr* (ATCC 1140) e *Candida krusei* (ATCC 44507).

A menor concentração de compostos fenólicos na fração hexânica e acetato de etila, esta envolvida com a apolaridade desses solventes que não possuem afinidade com compostos fenólicos (MILANI *et al.*, 2012). Neste trabalho, a apolaridade dos solventes pode ter interferido na sua afinidade com alcalóides, o que pode justificar a ausência desse composto nas duas frações (tabela 1).

O bio-óleo de *Crambe abyssinica* é rico em fenóis (ONOVEROLLI, 2012), que podem apresentar atividade antimicrobiana, sua toxicidade em microrganismos liga-se ao aumento da hidroxilação (ALMEIDA *et al.*, 2007). Não foi verificada a presença de fenóis nos grãos de *Crambe*, o que pode compreender fatores genéticos, ambientais e condições de processamento.

Os ácidos graxos saturados e insaturados nos extratos, também podem contribuir para a atividade antimicrobiana em cepas Gram-positivas e Gram-negativas (SILVEIRA *et al.*, 2005). Ácido oléico e linoléico são considerados potentes antimicrobianos. O ácido linoléico é capaz de inibir seletivamente a enzima FABI em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, responsável por catalisar a etapa final do processo de alongamento da cadeia de síntese dos ácidos gordos do tipo II (FAS-II) em bactérias (ORHAN *et al.*, 2009).

Neste trabalho os ácidos oléico e linoléico podem ter inibido *Escherichia coli* no extrato etanólico. A atividade antimicrobiana em *Candida albicans* pode ter sido ocasionada pelo sinergismo entre os ácidos encontrados. De acordo com Huang *et al.* (2010) o ácido linoléico, araquidônico, palmitoléico e oléico exibem atividade antimicrobiana contra patógenos *Streptococcus mutans*,

Candida albicans, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*.

Os membros da família Brassicácea são muito ricos em compostos fitoquímicos, apresentando papéis antimicrobianos, antifúngicos, antioxidantes, antimutagênico e antitumoral (JANJUA *et al.*, 2013).

A tabela 3 mostra a concentração inibitória mínima do extrato etanólico e demais frações sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706, *Candida albicans* 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275 e *Fusarium oxysporum* NRRL 1871.

Tabela 3: Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico e cinco frações frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 27664, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706, *Candida albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275 e *Fusarium oxysporum* NRRL 1871.

Extrato e Frações	S. aureus	E. coli	K. pneumoniae	C. albicans	A. niger	F.oxysporum
Etanólico	-	12,5mg/mL	-	25mg/mL	-	-
Hidroalcoólico	6,25 mg/mL	-	-	25mg/mL	-	-
Hexânico	-	-	-	-	-	25mg/mL
Clorofórmico	-	-	-	1,56mg/mL	6,25 mg/mL	-
Acetato de etila	-	-	-	-	-	3,12mg/mL

O extrato etanólico apresentou ação antimicrobiana em *Escherichia coli* 12,5 mg/mL, *Candida albicans* 25 mg/mL; fração hidroalcoólica *Staphylococcus aureus* 6,25 mg/mL, *Candida albicans* 25 mg/mL; fração hexânica *Fusarium oxysporum* 25 mg/mL; fração clorofórmica *C. albicans* 1,56 mg/mL, *Aspergillus niger* 6,25 mg/mL; fração Acetato de etila *Fusarium oxysporum* 3,12 mg/mL.

Neste trabalho a menor CIM foi encontrada na fração Clorofórmica e acetato de etila frente a *Candida albicans* 1,56 mg/mL e *Fusarium oxysporum*

3,12 mg/mL respectivamente. A técnica de CIM também foi empregada por Janjua *et al.* (2013), com o objetivo de testar extratos de *Raphanus sativus* L.var níger, os autores verificaram que os extratos correspondentes a acetato de etila e etanólico foram os mais eficazes. A fração acetato de etila apresentou menor valor de CIM correspondendo a 30 mg/mL em *Escherichia coli* e o valor mais elevado de 70 mg/mL contra *Enterobacter aerogenes*. O extrato etanólico obteve menor CIM, correspondendo a 40 mg/mL sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bordetella bronchiseptica*, seu valor mais elevado foi sobre *Salmonella typhi* e *Klebsiella pneumoniae*.

Blazevic *et al.* (2011), avaliando a CIM de amostras voláteis de *Aurinini leucade* (Guss.) C. Koch (Brassicaceae) verificaram valores de inibição de 2.0-32.0 µg/mL, indicando seu potencial antimicrobiano sobre fungos *Candida albicans*, *Rhizopus stolonifer* e bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

A atividade antifúngica da fração hexânica sobre *Fusarium oxysporum*, pode ser devido à presença de ácidos graxos, esteróides e triterpenos. Virtuoso *et al.* (2005) encontraram atividade antimicrobiana na fração hexânica frente a *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, justificando sua potencialidade a presença de esteróides e triterpenos na fração mais apolar.

Já a atividade antifúngica da fração clorofórmica deve-se a presença de alcalóides, esteróides e triterpenos disponíveis nesta fração (tabela 1). Podendo também apresentar compostos voláteis de enxofre, responsáveis pela sua atividade sobre *Candida albicans* ATCC 90028 e *Aspergillus niger* ATCC 6275.

O potencial antifúngico da fração acetato de etila pode estar relacionado à ação de esteróides e triterpenos.

A não atuação dos princípios ativos do extrato etanólico e frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica em *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 (KPC) tabelas (2 e 3) possivelmente esteja relacionado com as diferenças estruturais dessas bactérias, que dificultam a ação destes componentes.

Klebsiella spp. são bactérias Gram-negativas associadas a uma

significante morbimortalidade em seres humanos, esses microrganismos são capazes de produzir enzimas β -lactamases (ARNOLD *et al.*, 2011). Essas enzimas hidrolisam o anel beta-lactâmicos dos antibióticos como monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenêmicos, inativando sua ação (DOERN *et al.*, 2011).

5.6 Fracionamentos da fração hidroalcoólica para determinação de alcalóides

É possível verificar a presença de alcalóides nas frações hidroalcoólicas representadas por F1 e F4. Conforme mostra a tabela 4

Tabela 4: Alcalóides presentes na fração hidroalcoólica

Reagentes	F1	F2	F3	F4
Dragendorf	+	-	-	+
Mayer	+	-	-	+
Bouchardat	+	-	-	+

Martins *et al.* (2012), pretendiam avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de *Brassica oleracea* pertencente a família Brassicácea, verificaram a presença de alcalóides em extratos hidroalcoólicos. Apontando sua presença devido ao solvente hidroalcoólico apresentar maior eficiência, melhorando assim a solubilidade de substâncias semi-polares como no caso dos alcalóides.

Através da CIM (tabela 5), foi possível analisar a atividade antimicrobiana da fração hidroalcoólica frente as cepas *Candida albicans* ATCC 90028 e *Staphylococcus aureus* ATCC EKQ 27664, com concentração de 0,0019; 0,0039 ; 0,078; 0,015 ; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2.

Tabela 5 - Atividade antimicrobiana dos alcalóides presentes na fração hidroalcoólica sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*.

Cepas	Fração 1	Fração 2	Fração 3	Fração 4
<i>C. albicans</i>	0,5 mg/mL	-	2mg/ mL	0,5 mg/ mL
<i>S. aureus</i>	-	-	-	2 mg/ mL

Houve inibição em fração hidroalcoólica, que de acordo com os testes de RMN tratavam-se somente açúcares, porém testes fitoquímicos revelaram a presença de alcalóides, o fato deste composto não ser identificado nas análises de RMN, é evidenciado pela não solubilização da amostra no equipamento, o que talvez dificulte a caracterização de alguns compostos.

A atividade antimicrobiana da Fração 1 sobre *Candida albicans* e F 4 sobre *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* corresponde a presença de alcalóides nessas duas frações. Já a inibição na F3 corresponde a outros compostos.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico e demais frações frente a microrganismos Gram-negativos e fungo filamentosos isolado do rúmen.

Frações	63	69	94	128
Etanol	-	-	-	25 mg/mL
Hidroalcoólico	-	-	-	-
Hexano	-	-	-	25 mg/mL
Clorofórmio	-	-	-	3,12 mg/mL
Acetato de etila	-	-	-	1,56 mg/mL

O extrato etanólico, fração hexânica, clorofórmica e acetato de etila apresentaram potencial antifúngico sobre os fungos filamentosos isolados do rúmen. A atividade antifúngica correspondente ao extrato etanólico pode estar relacionado à atuação de alcalóides, ácidos graxos, esteróides e triterpenos. Fração hexânica ácidos graxos, esteróides e triterpenos. Fração clorofórmica alcalóides, esteróides e triterpenos. Fração acetato de etila esteróides e triterpenos.

Os Alcalóides e terpenos podem exibir efeitos específicos sobre microrganismos do rúmen (WARNER *et al.*, 1961). Alcalóides pirrolizidínicos (PAs) estão entre os grupos de toxinas de plantas que mais causam

intoxicações em seres humanos e animais (LODGE *et al.*, 2005; CREWS *et al.*, 2005). Essa toxina quando metabolizada por microrganismos do rúmen, tornam-se não tóxicas para animais ruminantes (FLEISCHMANN *et al.*, 2003).

Os terpenos são ingeridos por ruminantes em quantidades variáveis, a maioria das vezes sob condições de diferente alimentação. Broudiscou *et al.* (2007) verificaram extensiva degradação de monoterpenos e sesquiterpenos por microrganismos do rúmen. Segundo Malecky *et al.* (2008) concentrações acima de 20-40 ppm de monoterpenos apresentam toxicidade em vários grupos de microrganismos do rúmen. Os autores afirmam ainda que as diferenças entre as degradabilidade de terpenos não provêm de possíveis diferenças na sua toxicidade bacteriana. A ausência de atividade antibacteriana pode corresponder à adaptação de microrganismos Gram-negativos ruminais a compostos bioativos presentes nos grãos de *Crambe abyssinica*.

A tabela 7 mostra a atividade antifúngica do ácido palmítico sobre *Candida albicans* concentração de 0,5 mg/mL e *Aspergillus niger* 1 mg/mL. O que se torna um resultado promissor já que a maioria das infecções fúngicas está associada a esses dois microrganismos.

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima de ácido palmítico em *S. aureus* ATCC 27664 *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumonia* ATCC 1706, *C. albicans* ATCC 90028, *Aspergillus niger* ATCC 6275 e *Fusarium oxysporum* NRRL 1871.

Ácido Palmítico					
<i>S. aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
-	-	-	0,5 mg/ mL	1 mg/ mL	-

O ácido palmítico ligado a peptídeos que são inativos, ou seja, não apresentam atividade antimicrobiana, pode compensar a hidrofobicidade e ocasionar o potencial antifúngico (AVRAHAMI *et al.*, 2004). Esses peptídeos são absorvidos pela bicamada da membrana, provocando instabilidade e conseqüentemente a morte celular (PRATES *et al.*, 2000).

Huang *et al.* (2011), verificaram que o sinergismo entre o ácido palmítico e mirístico apresentavam atividade sobre bactérias Gram-negativas

Fusobacterium nucleatum. O que pode explicar a ausência da atividade antimicrobiana sobre as ATCCs *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum*, e microrganismos isolados do rúmen, já que foi testado somente o ácido palmítico isolado.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- Valores correspondentes a FDN, FDA e Carboidratos podem interferir na queda do pH.
- O pH não apresenta alteração inicial e final correspondente aos mesmos tratamentos em relação a cinética, devido a inclusão de saliva artificial.
- Há um aumento do pH em decorrência da crescente inclusão da torta de Crambe em substituição ao farelo de soja nos diferentes tratamentos.
- As concentrações da torta de Crambe proporcionaram crescimento da microbiota ruminal, com exceção dos Tratamentos 2 e 5.
- Os crescentes níveis de torta de Crambe apresentaram efeito sobre o pH e N-NH₃ do líquido ruminal.
- A triagem fitoquímica revela a presença de alcalóides no extrato etanólico, e frações clorofórmica e hidroalcoólica, a presença de alcalóides pode estar relacionada a glucosinolatos. O extrato etanólico e todas as frações em estudo apresentaram leve presença de esteróides e triterpenos.
- O extrato hexânico contém ácido palmítico, oléico, linoléico, linolênico e erúcico.

- Os espectros de RMN indicaram semelhança entre o extrato etanólico e fração hexânica tendo como componente majoritário o ácido oléico. As frações acetato de etila e clorofórmica também são semelhantes, porém testes químicos indicaram que a fração clorofórmica contém alcalóide, o que não foi verificado na fração acetato. Os espectros de RMN indicaram que a fração hidroalcoólica apresentava açúcares, os testes químicos revelaram a presença de alcalóides.

- A avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico, e frações hexânica e hidroalcoólica através de teste difusão em disco, mostraram atividade antimicrobiana do extrato etanólico sobre *Candida albicans* ATCC90028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. E fração hidroalcoólica frente as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 e *Candida albicans* ATCC 90028.

- O extrato etanólico exibiu atividade antimicrobiana sobre *Escherichia coli* (12,5 mg/mL) e *Candida albicans* (25 mg/mL). Fração hidroalcoólica sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 (6,25 mg/mL) e *Candida albicans* ATCC 90028 (25 mg/mL). Fração Hexânica *Fusarium oxysporum* NRRL 1871 (25 mg/mL). Fração clorofórmica *Candida albicans* (1,56 mg/mL) e *Aspergillus niger* ATCC 6275 (6,25 mg/mL). Fração acetato de etila *Fusarium oxysporum* (3,12 mg/mL).

- A CIM obtida a partir do fracionamento da fração hidroalcoólica permitiram confirmar a presença de alcalóides, onde Fração 1 apresentou inibição sobre *Candida albicans* ATCC 90028 (0,5 mg/mL) e Fração 4 *Candida albicans* ATCC 90028 (0,5 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (2 mg/mL).

- Foi possível observar através da CIM que o extrato e frações em estudo não apresentam atividade antibacteriana sobre os microrganismos Gram-negativos isolados do rúmen. Havendo potencial antifúngico do extrato etanólico e frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila.
- O ácido palmítico mostrou atividade antimicrobiana sobre *Candida albicans* ATCC 90028 (0,5 mg/ mL) e *Aspergillus níger* ATCC 6275 (1mg/mL).
- O extrato e frações provenientes dos grãos de *Crambe abyssinica* apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica de microrganismos ATCCs, o que é considerado um ótimo resultado, necessitando de novos estudos quanto a sua aplicação como nova droga.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEDDOU, S.; MAKKA, H. P. S. Potential and constraints in utilizing co-products of the non-edible oils-based biodiesel industry-an overview. **In: Biofuel co-products as livestock feed opportunities and challenges**. Roma: Animal Production And Health Division Cap.19, p. 325-338, 2012.

ABDELSHAFEEK, K. A.; DABOUB, A. M.; SETTA, L. M. A.; ZARKON, A. M. Study of lipids, glucosinolate-derived isothiocyanates and their antimicrobial activity of *Erucaria pinata*. **JASMR**, v. 6, n.2, p.135-142, 2011.

ABRÃO,F.O.; BARRETO,S.M.P.; GERASEEV,L.C.; DUARTE, E.R.; Ruminal anaerobic fungi of beef cattle and beef goats raised on tropical pastures. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 757-760, 2010.

ADAMS, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy Allured Publishing: Illinois-USA, p. 455, 1995.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. **Boletim Mensal do Biodiesel**, 2011.

AIRES, A. A. C. Compostos bioactivos em plantas Brassicácea e o potencial efeito na Saúde Humana, 2009.

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n.4, p. 487-491, 2001.

ALMEIDA, A. A. P. Atividade antimicrobiana de extratos fenólicos e nitrogenados do café: Avaliação in vitro e em modelo alimentar. 2007. 137p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ALVES, J. Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo sistemas químicos biológicos. 2010. 73p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade de Lisboa, Portugal, 2010.

ANDERSSEN, H. R., SORENSEN, H., 1985. Double iowrapeseed meal in diets of young bulls. Advances in the production and utilization of cruciferous crops. **In: Proceedings of the Seminar in the CEC Programme of Research on Plant Protein Improvement**. Copenhagen, p. 208–217, 1985.

ANDRÉS, P. L.; LUCIANO, G.; VASTA, V.; GIBSON, T. M.; BIONDI, L.; PRIOLO, A.; HARVEY, I. M. Dietary quebracho tannins are not absorbed, but increase the antioxidant capacity of liver and plasma in sheep. **British Journal Of Nutrition**, v. 14, p. 1- 8, 2012.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I. ; GRAMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A.; FILHO, A. B.; **Nutrição animal: as bases e os fundamentos da nutrição animal. Os alimentos**. 1 ed. São Paulo: Nobel, 2002.

ARNOLD, R. S.; THOM, K. A.; SHARMA, S.; PHILLIPS, M.; JOHNSON, K.; MORGAN, D. J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing bacteria. **Southern Medical Journal**, v. 104, n. 1, p. 40-45, 2011.

AVRAHAMI, D. A.; SHAI, Y. A new group of antifungal and antibacterial lipopeptides derived from non-membrane active peptides conjugated to palmitic acid. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12277-12285, 2004.

BARBOSA, F. A.; FARIA, G. A.; VILELA, H. Live yeast in bovine nutrition. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 1, p.143-150, 2004.

BARKU, V. Y. A.; BOAHEN, Y. O.; ANSAH, E. O.; DAYIE, N. T. K. D.; MENSAH, F. E. In-Vitro assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts of six wound healing medicinal plants. **Journal Of Natural Sciences Research**, v. 3, n. 1, p. 74-80, 2013.

BASSO, R. C.; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Liquid–liquid equilibrium of pseudoternary systems containing. **Fluid Phase Equilibria**, v. 333, p. 55-62, 2012.

BRASIL. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Plano Nacional de Agroenergia**, 2005.

BEHBAHANI, B. A.; YAZDIM, F. T.; MOHEBBI, M. Antifungal effect of edible film (CMC) containing of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on Citrus pathogens in vitro. **Scientific Journal Of Agricultural**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 2013.

BLAZEVIC, I.; RADONIC, A.; SKOCIBUSIC, M.; NICOLA, G. R.; MONTAUT, S.; IORI, R.; ROLLIN, P.; MASTELIC, J.; ZEKIC, M.; MARAVIC, A. Glucosinolate profiling and antimicrobial screening of *Aurinia leucadea* (Brassicaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, n. 12, p. 2310-2321, 2011.

BROUDISCOU, L. P.; CORNU, A.; ROUZEAU, A. *In vitro* degradation of 10 mono- and sesquiterpenes of plant origin by caprine rumen micro organisms. **Journal Of the Science Of Food and Agricultural**, v 87, n.9, p. 1653-1658, 2007.

BUSH, R. S.; NCHOLSON, J. W. G.; MACINTYRE, T. M.; MCQUEEEN, R. E. A comparison of candle and tower rapeseed meal in lamb, sheep andbeef steer rations. **Canadian Journal Of Animal Science**, v. 58, p. 369–376, 1978.

CALDWELL, D. R.; BRYANT, M. V. Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 794-801, 1966.

CARRERA, R. A. B.; VELOSO, C. M. ; KNUPP, L. S. ; JUNIOR, A. H. S.; DETMANN, E.; LANA, R. P. Protein co-products and by-products of the biodiesel industry for ruminants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 5, p.1202-1211, 2012.

CAMPOS, F. P.; BOSE, M. L. V.; BOIN, C; LANNA, D. P. D.; MORAIS; J. P. G. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão *in vitro*: 3. desaparecimento da matéria seca e/ou FDN pela produção de gás. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n. 2, 2000 b.

CAMPOS, W. E; BORGES, A. L. C. C.; SATURNINO, H. M.; SILVA, R. R.; SALIBA, E. O. S.; RODRÍGUEZ, N. M.; SOUSA, B. M.; ROGÉRIO, M. C. P. Protein digestibility of ruminant feeds by the three-step procedure. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n. 4, p. 295-302, 2007 a.

CAMPOS, D. R.; YONAMINE, M.; ALVES, M. J. N.; MOREAU, R. L. M.Determinação de esteroides androgênicos anabólicos em urina por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 4, p. 467-476, 2005.

CARLSSON, A. S.; YILMAZ, J. L.; GREEN, A. G.; STYMNE, S.; HOFVANDER, P. Replacing fossil oil with fresh oil – with what and for what? **European Journal Lipid Science and Technol**, v. 113, n. 7, p.812-831, 2011.

CARLSON, K. D.; GARDNER, J. C.; ANDERSON, V. L.; HANZEL,J.J. **Crambe: New Crop Success**, p. 306-322, 1996.

CARVALHO, E. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SANTOS, A. G. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2010.

CAYUNAO, C.; ERAZO, S.; BACKHOUSE, N.; BACHILER, L. T.; ZALDIVAR, M.; GARCIA, R. Estudio de la actividad antimicrobiana de un alcaloid oxindólico y actividad antioxidante de diferentes extractos de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. **Revista de Fitoterapia**, v. 4, n. 2, p. 152-154, 2004.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada á espectrometria de massas acoplada á espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, vol. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CLEEMPUT, S.; BECKER, H. C. Genetic variation in leaf and stem glucosinolates. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, p. 539-546, 2011.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M 100- S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 32, 2012.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Fundação Calouste Guibenkian, v. 3, 1032 p. 1982.

COSTA, L. M.; RESENDE, O.; GONÇALVES, D. N.; MAÇAL, K. A.; SALES, J. F. Storage of crambe fruit subjected to different drying. **African Journal Of Agricultural Research**, v. 7, n. 47, p. 6274-6280, 2012 a.

COSTA, D. R. L. Efeito da adubação azotada na composição química e propriedades antioxidantes de sementes de colza da cultivar Hydromel. 2012. 75 p. Dissertação (Mestrado)- Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012 b.

CREWS, C.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 1, p. 327-338, 2009.

CZAPLINSKA, M.; CZEPAS, J.; GWOZDZINSKI, K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. **Journal Potespy Biochemmi**, v. 58, n. 3, p. 235-244, 2012.

DAUBOS, P.; GRUMEL, V.; IORI, R.; LEONIR, O.; PALMIERI, S.; ROLLIN, P. *Crambe abyssinica* meal as starting material for the production of enantiomerically pure fine chemicals. **Industrial Crops And Products**, v. 7, n. 3, p. 187-193, 1998.

DE GRANDE, S. M. B.; NETO, F. R. A. A Espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massas EM-EM. **Química Nova**, v. 13, n. 3, p. 1991-199, 1990.

DE SÁ, J. F. Avaliação nutricional de alimentos para ruminantes. 2007. 70 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Do Sudoeste De Bahia, Itapetinga, 2007.

DIAS, H. L. C.; VALADARES FILHO, S. C.; SILVA, J. F. C.; PAULINO, M. D.; CECON, P. R.; VALADARES, R. F. D.; RENNÓ, L. N.; COSTA, M. A. L. Eficiência de síntese microbiana, pH e concentrações ruminais de amônia em novilhos F1 limousin x nelore alimentados com dietas contendo cinco níveis de concentrado1 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 555-563, 2000.

DILIKA, F.; BREMNER, P.D.; MEYER, J.J.M. Fitoterapia. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from helichrysum pedunculatum: a plant used during circumcision rites. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 450-453, 2000.

DOERN, C. D.; DUNNE JR, W. M.; BURNHAM, C. A. D. Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) production in non-*Klebsiella pneumoniae* *Enterobacteriaceae* isolates by use of the Phoenix, Vitek 2, and Disk Diffusion Methods. **Journal Of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 3, p. 1143-1147, 2011.

ESMAEILI, A.; MOAF, L.; TEZAZADEH, S.; AYYARI, M. Antioxidant and antibacterial activity of various extracts of malcolmia africana (L.) R. Br. **Zahedan Journal Research Medical Sciences**, v.15, p. 29-34, 2013.

FALK, K. L.; TOKUHISA, J. G.; GERSHENZON, J. The effect of sulfur nutrition on plant glucosinolate content: Physiology and Molecular Mechanisms. **Plant Biology**, v. 9, p. 573-581, 2007.

FALASCA, S. L.; FLORES, N.; LAMAS, M.C.; CARBALLO, S. M.; ANSCHAU, Crambe abyssinica: An almost unknown crop with. **Internation Journal Of Hydrogen Energy**, v. 35, n.11, p. 5808-5812, 2010.

FARIA, R. C. M.; REZENDE, M. J. C.; REZENDE, C. M.; PINTO, A.C. Desenvolvimento e validação de metodologia de análise de misturas biodiesel: diesel utilizando cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 30, n.8, p.1900-1905, 2007.

FLEISCHMANN, T. J.; WALKER, K. C.; SPAIN, J. C.; HUGHES, J. B.; CRAIG, A. M. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT by bovine ruminal microbes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 14, n.4, p. 957-963, 2003.

FLÓREZ, S. M.; GALLEGO, J. G.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, n.6, p. 271-278, 2002.

FONSECA, A. J. M.; SILVA, A. A. Effects of rumen defaunation on productivity in ruminants – A review. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 60-64, 2001.

FRANÇA, A. B.; MORENZ, M. J. F.; LOPES, A. S.; MORENZ, D. A.; FARIA, B.; CABRAL, L. S.; FONSECA, C. E. M. Bakery waste in sheep diets: intake, digestibility, nitrogen balance and ruminal parameters. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 147-153, 2012.

FRANZOLIN, R.; BURK, A. D. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n.10, p.2262-2267, 2010.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; SILVA, L. M. G. E. ; SARMENTO, U. C. Substancias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.20, p.1-30, 2013.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. Metabolismo secundario de plantas. **Fisiologia Vegetal**. Facultad de Biología, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GOES, R. H. T. B.; SOUZA, K. A. PATUSSI, R. A. CORNELIO, T. C.; OLIVEIRA, E. R.; BRABES, K. C. S. Degradabilidade in situ dos grãos de crambe, girassol e soja, e de seus coprodutos em ovinos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 271-277, 2010.

GOULARTE, S. R.; ÍTAVO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; ÍTAVO, C. C. B. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; FAVARO, S. P.; DIAS, A. M.; JUNIOR TORRES, R. A. A.; BITTAR, C. M. M. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n. 6, p. 1479-1486, 2011.

HIGUERA, C. S. Estructura de las comunidades microbianas ruminales de ovejas alimentadas com diferentes dietas. 2012. 252 p. Tese (Doutorado) - Universidad De León, León, 2012.

HUANG, C. B.; GEROGÉ, B.; EBERSOLE, J. L. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. **Archives Of Oral Biology**, v. 55, n. 8, p. 555-560.

HUANG, C. B.; ALTIMOVA, Y.; MYERS, T. M.; EBERSOLE, J. E. Short-and médium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **Archives Of Oral Biology**, v.56, n. 7, p. 650-654, 2011.

ÍTAVO, L. C. V.; FILHO, S. C. V.; SILVA, F. F.; VALADARES, R. F. D.; CECON, P. R.; ÍTAVO, C. C. B. F.; MORAES, E. H. B. K.; PAULINO, P. V. R. Níveis de concentrado e proteína bruta na dieta de bovinos nelore nas fases de recria e terminação: consumo e digestibilidade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n. 2, p.1033-1041,2002.

JAHANGIR, M.; KIM, K.H.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. Health-affecting compounds in Brassicaceae. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Saffety**, v. 8, n. 2, p. 13-36, 2009.

JANJUA, S.; SHAHID, M.; ABBAS, F. I. Phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of root peel extract of *Raphanus sativus* L. var niger. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2013.

JASPER, S. P.; BIAGGIONI, M. A. M.; SILVA, P. R. A.; SEKI, A. S.; BUENO, O. C. Análise energética da cultura do Crambe. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 3, p.395-403, 2010a.

JASPER, S. P. CULTURA DO CRAMBE (*Crambe abyssinica* Hochst). 2009. 120 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "julio De Mesquita Filho, Botucatu, 2009b.

KAHKONEM, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H.; RAUHA, J. P.; IHLAJA, K.; KULAJA, T. S.; HEINONEM, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KARAMAN, I.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2, p. 231-235, 2003.

KYUNG, K. H. Antimicrobial activity of volatile sulfur compounds in foods. Seoul. **Departament Of Food Science**, v. 1068, p. 323-338, 2011.

KNOTHE, G.; STEIDLEY, K. R. Kinematic viscosity of biodiesel components (fatty acid alkyl esters) and related compounds at low temperatures. **Fuel.**, v. 86, n. 16, p. 2560-2567, 2007.

KUCHERNIG, J.; BUROW, M.; WITTSTOCK, U. Evolution of specifier proteins in glucosinolate-containing. **BMC Evolutionary. Biology**, v. 12, n. 127, p. 2-14, 2012.

KUMAR, M.; NEHRA, K.; DUHAN, J. S. Phytochemical Analysis and antimicrobial efficacy of leaf extracts of *Pithecellobium Dulce*. **Asian Journal Of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 1, p. 70-76, 2012.

LADEIRA, M. M.; VALADARES FILHO, S. C.; LEÃO, M. I.; SILVA, J. F. C.; SILVA, R. B. Eficiência microbiana, concentração de amônia e pH ruminal e perdas nitrogenadas endógenas, em novilhos nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 2, p. 404-411, 1999.

LALAS, S.; GORTZI, O.; DIS, V. A.; DOURTOGLOU, E.; DOURTOGLOU, V. Full Characterisation of *Crambe abyssinica* Hochst. Seed Oil. **Journal Of the American Oil Chemists Society**, v. 89, n. 12, p. 2253–2258, 2012.

LAZZERI, L.; LEONI, O.; CONTE, L. S.; PALMIERI, S. Some technological characteristics and potential uses of *Crambe abyssinica* products. **Industrial Crops And Products**, v. 3, n.1, p. 103-112, 1994.

LIMA, W. Q. F.; PEREIRA, T. C. D.; BRITO, N. J. N.; ZAMPIERON, R. G.; SILVA, G. A. Avaliação fitoquímica e antioxidante de plantas medicinais do norte do Mato Grosso, 17 p. 2013.

LIMA, H. L. Parâmetros nutricionais em novilhos suplementados com torta de girassol em pastejo de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. 2011. 89 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2011.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. BIODIESEL: Parâmetros de qualidade e métodos analíticos. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p.1596-1608, 2009.

LODGE, S. L.; RAPPE, M. S.; JOHNSTON, W. H.; CRAIG, A. M. Molecular analysis of a consortium of ruminal microbes that detoxify pyrrolizidine alkaloids. **Canadian Journal Of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 455-465, 2005.

LUZANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância Magnética Nuclear-Ferramenta versátil em química farmacêutica e imagiologia médica. **Centro Químico Estrutural**, v. 117, p. 25-30, 2010.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V.F. NOEMA, F. G.; ECHEVARRIA, A. Plantas Mediciniais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALECKY, M.; FERLR, V.; BROUFIDOU, L. P. In vitro degradation by mixed rumen bacteria of 17 mono- and sesquiterpenes typical of winter and spring diets of goats on Basilicata rangelands (southern Italy). **Journal Of the Science Of Food Agriculture**, v. 89, p. 531-536, 2008.

MARAGONI, C.; MOURA, N. F.; GARCIA, F.R.M. Utilização de óleos essenciais e extratos de plantas no controle de insetos. **Revista de Ciências Ambientais**, v.6, n. 2, p. 95-112, 2012.

MARTINS, L. D.; COSTA, F. P.; LOPES, J. C. Light influence on seed germination of Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst). **Nucleus**, v. 8, n. 1, p. 405, 2011.

MARTINS, T. V. F.; ALMEIDA, P. S. V. B.; OLIVEIRA, L. L. O.; AMARO, M. O. F.; PRÁ, V. D.; MAZUTTI, M.; ROSA, M. B. Atividade antibacteriana de *Brassica oleracea* var. *capita* em modelos experimentais *in vitro*. **Monografias Ambientais**, v. 9, n. 9, p. 2088-2100, 2012.

MEDEIROS, A. J. A.; SANTOS, E. C. G. Avaliação do efeito sinérgico antibacteriano de plantas constituídas por compostos sulfurados, 8 p., 2010.

MATEJIC, J. S.; KRSTV, T. M. M.; RANDELOVIC, V. N.; KRIVOSEJ, Z. D.; MARIN, P. D. Total phenolic and flavonoid content, antioxidant and antimicrobial activity of extracts from *Tordylium maximum*. **Journal Of Applied Pharmaceutical Science**. v. 3, n. 1, p. 055-059, 2013.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotics. **Feed Mix Special**, 2000.

MERCK, E. **Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel**. Darmstadt: Merck, 76 p. 1980.

MENDONZA, G. D.; BRITTON, R. A. E.; STOCK, R. A. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. **Journal Animal Science**, v. 71, n. 6, p. 1572-1579, 1993.

MESSANA, J. D.; BERCHIELLI, T. T.; ARCURI, P. B.; REIS, R. A.; CANESIN, R. C.; RIBEIRO, A. A.; FIORENTINI, G.; FERNANDES, J. J. R. Rumen fermentation and rumen microbes in Nellore steers receiving diets with different lipid contents. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 42, n. 3, p. 204-212, 2013.

MIZUBUTI, I. Y.; RIBEIRO, E. L. A.; PEREIRA, E. S.; PINTO, A. P.; FRANCO, A. L. C.; SYPPERRECK, M. A.; DÓREAS, J. R. R.; CUNHA, G. E.; CAPELARI, M. G. M.; MUNIZ, E. B. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* de alguns co-produtos gerados na cadeia produtiva do biodiesel pela técnica de produção de gás **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 1, p. 2021-2028, 2011.

MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; CICHOSKI, A. J.; REZER, A. P. S.; BACKES, A. M.; PARODIA, C. G. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Rama Forte) extracts. **Brazilian Journal Of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 118-124, 2012.

MOHAMED, E. A.; ATY, A. M. A. Cruciferous plants: phytochemical toxicity versus cancer. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 13, p.1470-1478, 2009.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: Uma abordagem da química á ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MONYEM, GERPEN, J. H. V. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. **Biomass And Bioenergy**, Ames, v. 20, n. 4, p.317-325, 2001.

MOREIRA, P. C.; MENDONÇA, A. C.; MARTINS, A. F.; WASCHECK, P. R. S.; DUTRA, A. R.; GRANDSIRE, C.; REZENDE, P. L. P.; CARDOSO, J. R.; BENETTI, J. E.; SILVA, M. S. B. Avaliação do pH do fluido ruminal de vacas leiteiras. **Estudos**, v. 36, n. 11, p. 1201-1218, 2009.

NAGARAJA, T. G.; TOWNE, G.; BEHARKA, A. A. Moderation of ruminal fermentation by ciliated protozoa in cattle fed a High-Grain diet. *Applied Environmental Microbiology*, v.58, n. 8, p. 2410-2414, 1992.

NETO, S. F. C.; ZEOULA, L. M.; PRADO, I. N.; BRANCO, A. F.; KAZAMA, R.; GERON, L. J. V.; MAEDA, E. M.; FERELI, F. Proteína degradável no rúmen na dieta de bovinos: digestibilidades total e parcial dos nutrientes e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p.1094-1102, 2008.

NSIBANDE, B. E. In vitro regeneration of four Hypoxis Species and transformation of *Camelina sativa* and *Crambe abyssinica*. **Sveriges Lantbruksuniversitet**, p. 1-45, 2013.

ORHAN, I.; OZCELİK, B.; SENER, B. Evaluation of antibacterial, antifungal, antiviral, and antioxidant potentials of some edible oils and their fatty acid profiles. **Turk Journal Biology**, v. 35, p. 251-258, 2009.

OLIVA, A. C. E. Qualidade de sementes de Crambe submetidas a métodos de secagem e períodos de armazenamento. 2010. 87 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "julio De Mesquita Filho, Botucatu, 2010.

OLIVEIRA, V. S.; NETO SANTANA, J. A.; VALENÇA, R. L. Chemical and physiological characteristics of rumen fermentation in frazing cattle- review. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 20, p. 1-21, 2013.

ONOVEROLI, B. Estudo do Crambe abyssinica como fonte de matérias primas oleaginosas: óleo vegetal, ésteres metílicos e bio-óleo. 2012. 132p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ONWUKA C. F. I.; ISAH O.A.; ONI, A. O.; ADERINBOYE R.Y. **Ruminant animal nutrition ANN 503**, 2013.

OPLINGER, E. S.; OELKE, A. R.; PUTNAM, D. R., TEYNOR, T. M., DOLL, J. D., KELLING, K. A., DURGAN, B.R., NOETZEL, D. M. **Crambe**. Alternative field crops manual. University of Wisconsin- Madison, 1991.

OTOGURO, K.; IWATSUKI, M.; ISHIYAMA, A.; NAMATAME, M.; TUKASHIMA, A. N.; KIYOHARA, H.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y.; ŌMURA, S.; YAMADA, H. In *vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 16, p. 2024-2030, 2011.

OYELEKE, S. B.; OKUSNMI, T. A. Isolation and characterization of cellulose hydrolyzing microorganism from the rumen of ruminants. **African Journal Of Biotechnology**, v. 7, n. 10, p. 1503-1504, 2008.

PARISH, J. Ruminant digestive anatomy and function. **Cattle Business In Mississippi**, p.1-4, 2011.

PERIPOLLI, V.; BACELLOS, J. O .J.; PATRES, E, R.; WILBERT, C. A.; LOPES, R. B. Mineral composition of protein soybean hull for feeding ruminants. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 40, n. 1, p. 1-6, 2011.

PIMENTEL, P. G.; REIS, R. B.; LEITE, L. A.; CAMPOS, W. E.; NEIVA, J. N. M.; SATURNINO, H. M.; COELHO, S. G. Ruminal fermentative parameters and concentration of purine derivatives in lactating dairy cows fed cashew nut. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 4, p. 959-966, 2012.

PICCIRILLO, S.; DEMIRAY, S.; SILVA FERREIRA, A. C; PINTADO, M. E.; CASTRO, P. M. L. Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from Ginja cherry plant. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 562-569, 2013.

PRATES, M.V.; BLOCH JÚNIOR, C. Peptídeos antimicrobianos. **Biociência & Desenvolvimento**, p. 30-36, 2000.

QUERALT, A. V.; JÁUREGUI, O.; LECCE, G. D.; LACUEVA, C. A.; RAVENTÓS, R. M. L. Screening of the polyphenol content of tomato-based products through accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI-QTOF). **Journal Food Chemistry**, v. 129, p. 877-883, 2011.

RAMOS, R. S.; SARMENTO, P. A.; LINS, R. H.; LUCIO, I. M. L.; CONSERVA, L. M.; BASTOS, M. L. A. In vitro antimicrobial activity of hexane and ethanol extracts of *Zeyheria tuberculosa* leaves. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, v. 13, n. 5, p. 1-10, 2012.

RAMPAL, G.; KHANNA, N.; THIND, T. S.; ARORA, S. VIG, A. P. Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing. **Medicinal Chemistry & Drug Discovery**, v. 3, n. 2, p. 79-93, 2012.

RASHID, M. M.; ALZAHAL, O.; BRID, B. W. Studies on the production of conjugated linoleic acid from linoleic and vaccenic acids by mixed rumen protozoa. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 533-541, 2008.

RAUT, I. S.; SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. **Journal Biofouling**, v. 29, n. 1, p. 87 – 96, 2013.

RAZAVI, S. M.; ZARRINI, G.; ZAHRI, S.; GHASEMI, K.; MOHAMMADI, S. Biological activity of *Crambe orientalis* L. growing in Iran. **Journal Pharmacognosy Research**, v. 1, n. 3, p. 125-129, 2009.

RINEHART, L. Ruminant Nutrition for Graziers. **ATTRA National Sustainable Agriculture**, 2008.

RUIZ, T. L. **Microbiologia Zootécnica**. 1º Ed. São Paulo: Roca, 1992.

RUSSEL, J. B.; CONNOR, J. D.; FOX, D. G. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets ruminal fermentation. **Journal Of Animal Science**, p. 3551-3561, 1992.

RUSSEL, J.B. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition, 2002.

SALAS, R. Z.; BUILES, A. G.; ECHEVERRY, D. P. Role of rumen ciliated protozoa in the synthesis of conjugated linoleic acid. A review. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 25, n. 1, p. 135-149, 2012.

SANTIAGO, L. B.; ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R. R.; SANTOS, V. W. S; RODRIGUES, A. S.; CHAPAVAL, L.; BRITO, L. F.; SOUSA, F. G. C. Avaliação in vitro da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 593-600, 2010.

SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de ¹H para análises de formulações farmacêuticas. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 324-330, 2013.

SANTOS, M. S.; POSER, G. V.; BORDIGNON, S.; RIBEIRO, V. L. S.; FERRAZ, A. B. F. Análise química e avaliação da atividade acaricida das folhas de *Piper amalago*, *P. mikanianum* e *P. xylosteoides* em larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, p. 65-71, 2010.

SCHIEVANO, E.; PEGGION, E.; MAMMI, S. ¹H Nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p. 57-65, 2010.

SERRANO, R. D. C.; SIERRA, L. M. P. Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review. **Revista CES Medicina Veterinária y Zootecnia**, v. 6, n.1, p. 46-53, 2011.

SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açaí (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 400-406, 2013.

SILVA, T. R. B.; LAVAGNOLLI, R. F.; NOLLA, A. Zinc and phosphorus fertilization of crambe (*Crambe abyssinica* Hoechst). **Journal Of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 264-267, 2011.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S.; JUNIOR NEVES, I.; MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 15, n. 2, p. 143-148, 2005.

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

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2002.

SIQUEIRA, E. P.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Fingerprint of volatiles from plant extracts based on SPME-GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 17, n. 4, p. 565-571, 2007.

SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-manso, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

SINGH, K. V. & SHUKLA, N. P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract: **Fitoterapia**, v. 55, p. 313-315, 1984.

SPINGDALE CROP SYNERGIES LTD. **Crambe (Abyssinian mustard)**. Agronomy Update late, 14 p., 2005.

TANG, H.; WANG, E. A.; SALLEY, E. S.; NG SIMON, .K. Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative. **Journal Of the American Chemical Society**, v. 85, p. 373-782, 2008.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 33, p.281-301, 2000.

TEIXEIRA, J.C. **Nutrição de ruminantes**. Lavras: UFLA/FAEPE, 200p. Curso de Pós-Graduação "Lato-Sensu" (Especialização) a Distância: Produção de Ruminantes, 1997.

TRIPATHI, M. K.; MISHRA, A. S. Glucosinolates in animal nutrition: A review. **Animal Feed Science And Technology**, v. 132, n. 1, p. 1-27, 2007.

VIANNI, R.; BRAZ FILHO, R. Ácidos Graxos Naturais: Importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v. 19, n. 4, p. 400-407, 1996.

VIEGAS JUNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: Uma alternativa para o controle Químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; DIAS, J. F. G.; CUNICO, M. M.; MIGUEL, M. D. OLIVEIRA, A. B.; MIGUEL, O. G. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

VOLZ, T. J.; CLAUSEN, T. P. Tannins in *Puccinellia arctica*: possible deterrents to herbivory by Canada geese. **Journal Of Chemical Ecology**, v. 27, n. 4, p. 725-732, 2001.

WALL, J. M. et al. Steroidal sapogenins VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. **Journal Of the American Pharmaceutical Association**, v. 43, n.1, p. 1-7, 1954.

WARNER, A. C. I. Some factors influencing the rumen microbial population. **Journal Of General Microbiology**, v. 28, p. 129-146,1961.

WAXILEWSKI, W. T.; BARICCATTI, R. A.; MARTINS, G. I.; SECCO, D.; SOUZA, S. N. M.; ROSA, H. P.; CHAVES, L. I. Study of the methyl crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) and soybean biodiesel oxidative stability. **Industrial Crops And Products**, v. 43, p. 207-212, 2013.

WEI, F.; FURIHATA, K.; KODA, M.; HU, F.; MIYAKAWA, T.; TANOKURA, M. Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: time course of changes in composition. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1005-1012, 2012.

WEIMER, P. Ruminant cellulolytic bacteria. **Us Dairy Forage Research Center**. p. 53-60, 1996.

WEISS, E.A. Oilseed crops. second addition. Blackwell Science, 2000.

WIDIAWATI, Y.; WINUGROHO M.; TELENI E. Nitrogen kinetics in growing sheep consuming leucaena leucocephala. **Journal Ilmu Ternak dan Veteriner**, v. 17, n. 3, p. 215-220, 2012.

WILKINSON, J.; HERRERA, S. Biofuels in Brazil: debates and impacts. **The Journal Of Peasant Studies**, v. 37, n. 4, p. 749-768, 2010.

YANG, H.; GE, Y.; SUN, Y.; LIU, D.; YE, X.; WU, D. Identification and characterisation of low-molecular-weight phenolic compounds in bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) leaves by HPLC-DAD and HPLC-UV-ESIMS. **Journal Food Chemistry**, v. 128, p. 1128-1135, 2011.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharmaceutical Biology** ., v.39, n.3, p.221-225, 2001.

ZHENG, C. J.; YOO, J. S.; LEE, T. G.; CHO, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, W. G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **Febs Letters**, v. 579, n. 23, p. 5157-5162, 2005.

Apêndice A

Tabela 8: coletas referentes a diferentes concentrações de torta de *Crambe abyssinida*, CPP, FFL e pH.

COLETAS	CONCENTRAÇÃO %	TEMPO (min)	REPETIÇÃO	AMOSTRA	CPP	FFL*	pH**	
							Antes	Depois
1	0	0	1	1	8,63	2,86	6,24	6,24
2	0	0	2	1	8,07	2,97	6,08	6,08
3	0	0	3	1	8,33	3,06	6,2	6,2
4	0	30	1	1	10,38	3,5	6,82	6,69
5	0	30	2	1	10,57	3,45	6,62	6,51
6	0	30	3	1	10,13	2,32	6,62	6,68
7	0	60	1	1	9,12	2,82	6,62	6,68
8	0	60	2	1	9,06	2,9	6,65	6,57
9	0	60	3	1	9	2,99	6,23	6,25
10	0	120	1	1	10,29	2,88	6,13	6,27
11	0	120	2	1	10,4	2,6	6,23	6,18
12	0	120	3	1	10,34	3,47	6	6,03
13	0	240	1	1	8,11	3,28	6,12	6,09
14	0	240	2	1	7,94	2,53	6,02	6,3
15	0	240	3	1	8,28	2,47	6,48	6,47
1	2,5	0	1	1	9,62	2,97	6,55	6,55
2	2,5	0	2	1	9,38	2,81	6,39	6,39
3	2,5	0	3	1	9,15	2,86	6,45	6,45
4	2,5	30	1	1	10,11	3,52	6,8	6,67
5	2,5	30	2	1	10,16	3,5	6,61	6,53
6	2,5	30	3	1	10,06	2,16	6,71	6,67
7	2,5	60	1	1	9,53	2,83	6,66	6,63
8	2,5	60	2	1	9,51	2,93	6,61	6,53
9	2,5	60	3	1	9,49	2,97	6,25	6,18
10	2,5	120	1	1	8,61	2,91	6,25	6,32
11	2,5	120	2	1	8,81	2,14	6,35	6,29
12	2,5	120	3	1	8,41	3,47	6,23	6,22
13	2,5	240	1	1	10,06	3,32	6,36	6,22
14	2,5	240	2	1	10,24	2,67	6,19	6,25
15	2,5	240	3	1	10,64	2,36	6,35	6,48
1	5	0	1	1	6,04	2,77	6,65	6,65

2	5	0	2	1	7,24	2,84	6,53	6,53
3	5	0	3	1	6,64	2,9	6,71	6,71
4	5	30	1	1	10,64	3,6	6,84	6,68
5	5	30	2	1	10,24	1,95	6,65	6,54
6	5	30	3	1	11,04	2,43	6,7	6,6
7	5	60	1	1	9,42	2,82	6,64	6,61
8	5	60	2	1	9,27	3,03	6,61	6,5
9	5	60	3	1	9,34	3,18	6,46	6,51
10	5	120	1	1	9,11	3,06	6,38	6,41
11	5	120	2	1	8,68	2,53	6,54	6,38
12	5	120	3	1	8,89	3,47	6,32	6,27
13	5	240	1	1	8,16	3,45	6,49	6,38
14	5	240	2	1	9,23	2,66	6,96	6,43
15	5	240	3	1	8,69	2,43	6,47	6,57
1	10	0	1	1	9,87	2,99	6,73	6,73
2	10	0	2	1	9,9	2,9	6,73	6,73
3	10	0	3	1	9,17	2,9	6,74	6,74
4	10	30	1	1	8,57	3,55	6,83	6,71
5	10	30	2	1	8,47	2,06	6,64	6,52
6	10	30	3	1	8,38	2,39	6,71	6,62
7	10	60	1	1	10,38	2,46	6,61	6,6
8	10	60	2	1	10,47	3,31	6,65	6,53
9	10	60	3	1	10,1	3,28	6,54	6,5
10	10	120	1	1	9,12	2,83	6,69	6,64
11	10	120	2	1	9,39	2,17	6,55	6,48
12	10	120	3	1	8,86	3,47	6,55	6,43
13	10	240	1	1	8,27	3,42	6,35	6,4
14	10	240	2	1	6,63	2,7	6,52	6,43
15	10	240	3	1	7,45	2,51	6,42	6,47
1	15	0	1	1	9,48	3,14	6,76	6,76
2	15	0	2	1	9,9	3,12	6,92	6,92
3	15	0	3	1	9,69	3,06	6,82	6,82
4	15	30	1	1	7,11	3,6	6,8	6,77
5	15	30	2	1	8,82	1,92	6,67	6,55
6	15	30	3	1	7,96	2,49	6,7	6,63
7	15	60	1	1	10,3	2,74	6,65	6,6
8	15	60	2	1	10,45	3,31	6,62	6,54
9	15	60	3	1	10,16	2,93	6,88	6,68
10	15	120	1	1	7,98	2,8	6,8	6,69

11	15	120	2	1	8,46	2,72	6,72	6,54
12	15	120	3	1	7,5	3,47	6,67	6,53
13	15	240	1	1	9,49	3,41	6,74	6,49
14	15	240	2	1	9,6	2,93	6,68	6,62
15	15	240	3	1	9,72	2,38	6,47	6,32
1	BRANCO	0	1	1	10,06	3,01	6,75	6,75
2	BRANCO	0	2	1	9,87	2,98	7,03	7,03
3	BRANCO	0	3	1	9,69	2,86	6,88	6,88
4	BRANCO	30	1	1	9,97	3,49	6,8	6,73
5	BRANCO	30	2	1	10,26	2,09	6,63	6,56
6	BRANCO	30	3	1	9,69	2,42	6,74	6,69
7	BRANCO	60	1	1	9,67	2,81	6,67	6,63
8	BRANCO	60	2	1	9,66	3,24	6,64	6,47
9	BRANCO	60	3	1	9,68	3,21	7,14	7,03
10	BRANCO	120	1	1	8,68	3,33	6,96	7
11	BRANCO	120	2	1	8,65	2,29	6,77	6,68
12	BRANCO	120	3	1	8,71	3,47	6,87	6,66
13	BRANCO	240	1	1	10,45	3,39	6,85	6,61
14	BRANCO	240	2	1	10,3	2,89	6,85	6,64
15	BRANCO	240	3	1	10,16	2,11	6,43	6,5

Apêndice B

Tabela 9: Composição da ração referente aos diferentes tratamentos.

Produção de 100Kg de matéria					
Alimento	0%	2,5%	5%	10%	15%
F. de arroz integral	40,1327	40,1634	40,1941	40,2557	40,3175
Calcário	2,2324	2,2341	2,2358	2,2392	2,2427
Flor de enxofre	0,893	0,8936	0,8943	0,8943	0,8943
Fosfato bicálcico	1,3809	1,3819	1,383	1,3851	1,3872
Milho grão	38,2012	38,0531	37,9047	37,6073	37,309
Mineral	0,893	0,8936	0,8943	0,8943	0,8943
Sal comum	0,902	0,9027	0,9034	0,9047	0,9061
Farelo de soja	15,0498	12,5511	10,0485	5,032	
Torta de crambe		2,455	4,9138	9,8428	14,7868
Uréia	0,3152	0,4715	0,628	0,9418	1,2566
Tota Ide concentrado	100	100	100	100	100
Níveis de garantia					
Nutrientes (Qtde/ MS%)					
Cálcio	1,5543	1,758	1,9617	2,3691	2,7765
Extrato etéreo	7,8212	8,2738	8,7265	9,6318	10,5372
FDA	7,98	8,6528	9,3256	10,6713	12,0169
Fósforo	1,3121	1,2939	1,2757	1,2394	1,203
NDT	78,7294	78,5507	78,3721	78,0147	77,6574
PB	18	18	18	18	18

Apêndice C

Tabela 10: Teores em porcentagem, da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), hemicelulose (HCEL), lignina (LIG), carboidratos não fibrosos (CNF), nutrientes digestíveis totais (NDT), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), Extrativo não nitrogenado (ENN) e matéria mineral (MM) dos concentrados.

	C0	C2,5	C5	C10	C15	CV (%)
MS	91.50a	93.21a	94.87a	97.23a	93.69a	4,57
PB	16.20a	14.85a	15.48a	14.56a	14.01a	13,82
EE	9.69a	9.66a	9.96a	9.97a	11.42a	21,83
FDN	51,87a	36.05c	43.37b	37.95c	40.45 bc	6,98
FDA	8.49a	5.87b	9.23a	6.47b	6.70 b	11,94
HCEL	43.38a	30.17b	34.13b	31.47b	33.75b	9,34
LIG	4.72a	2.59b	5.00a	2.81b	3.13b	15,66
CNF ⁺	38.42c	54.28a	46.66b	52.07ab	48.11ab	7,44
NDT ⁺	83.19a	84.37a	77.61a	80.25a	85.76a	5,58
DIVMS	88.75a	90.18a	82.02a	85.21a	91.85a	6,32
ENN ⁺	51.22a	56.26a	52.62a	56.64a	55.29a	6,60
CHOT ⁺	59.72a	62.14a	61.85a	63.12a	62.01a	5,82
MM	14.37a	13.32a	12.69a	12.33a	12.56a	17,68

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

⁺ ENN = 100-(%PB+%EE+%FB+%MM); %CHOT = 100-(%PB+%EE+%MM); %CNE=%CT-%FDNcp; %NDT = 9,6134+0,829DM

Apêndice D

Tabela 11: Análise de Variância de regressão

Fontes de variação	GL	Quadrado Médio	F
Devido a Regressão	2	0.8840476E-01	7.84
Independente	12	0.1127365E-01	

Apêndice E: Preparo dos reagentes e procedimentos fitoquímicos

Alcalóides

Foi dissolvido e filtrado 5 mg do extrato etanólico e das frações hexânica clorofórmica, acetato de etila e hidroalcoólica em 6 mL de ácido clorídrico a 1%. A solução foi adicionada a três tubos (2 mL em cada um) e adicionado 5 gotas dos seguintes reagentes (um reagente por tubo):

- Reagente Dragendorff: sendo a solução A: Subnitrato de bismuto (0,17g), Ácido acético glacial (2mL) e água destilada (8mL) e a solução B: Iodeto de potássio (1,6g) e água destilada (4mL);
- Reagente de Mayer: Cloreto de Mercúrio (280mg), Iodeto de Potássio (1g), Água destilada (20mL);
- Reagente de Bouchardat (COSTA, 1982): 4g de Iodeto de Potássio, 2g de Iodo e 100 mL de água destilada, até completa homogeneização.

Esteróides e triterpenóides

Foi dissolvido e filtrado 5 mg do extrato etanólico e demais frações, logo a solução foi transferida para um tubo de ensaio contendo 3 mL de clorofórmio. Em seguida, adicionou-se 2 mL de anidrido acético ao extrato e o mesmo foi agitado suavemente. Posteriormente acrescentou-se 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, para que houvesse precipitação dos compostos.

Flavonóides

Foi dissolvido e filtrado 5 mg do extrato etanólico e das demais frações, logo a solução foi transferida para um tubo de ensaio contendo 3 mL de metanol, onde foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado e um pedaço de fita de Magnésio.

Ácidos orgânicos

Em um tubo de ensaio foi dissolvido e filtrado 5 mg do extrato e das demais frações em 3 mL de água destilada. Foi adicionado gotas do reagente de Pasková, conforme segue:

Solução A: verde de bromo cresol (15mg), azul de bromo fenol (5 mg), etanol (20mL)

Solução B: permanganato de potássio (0,05 g), carbonato de sódio (0,1g) e água destilada(20mL) .

Fenóis e Taninos

Dissolveu-se e filtrou-se 5 mg do extrato etanólico seco e das demais frações, em seguida foi rotaevaporado em 5 mL de água destilada, logo foi adicionado 1 a 2 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 1%.

Apêndice F- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

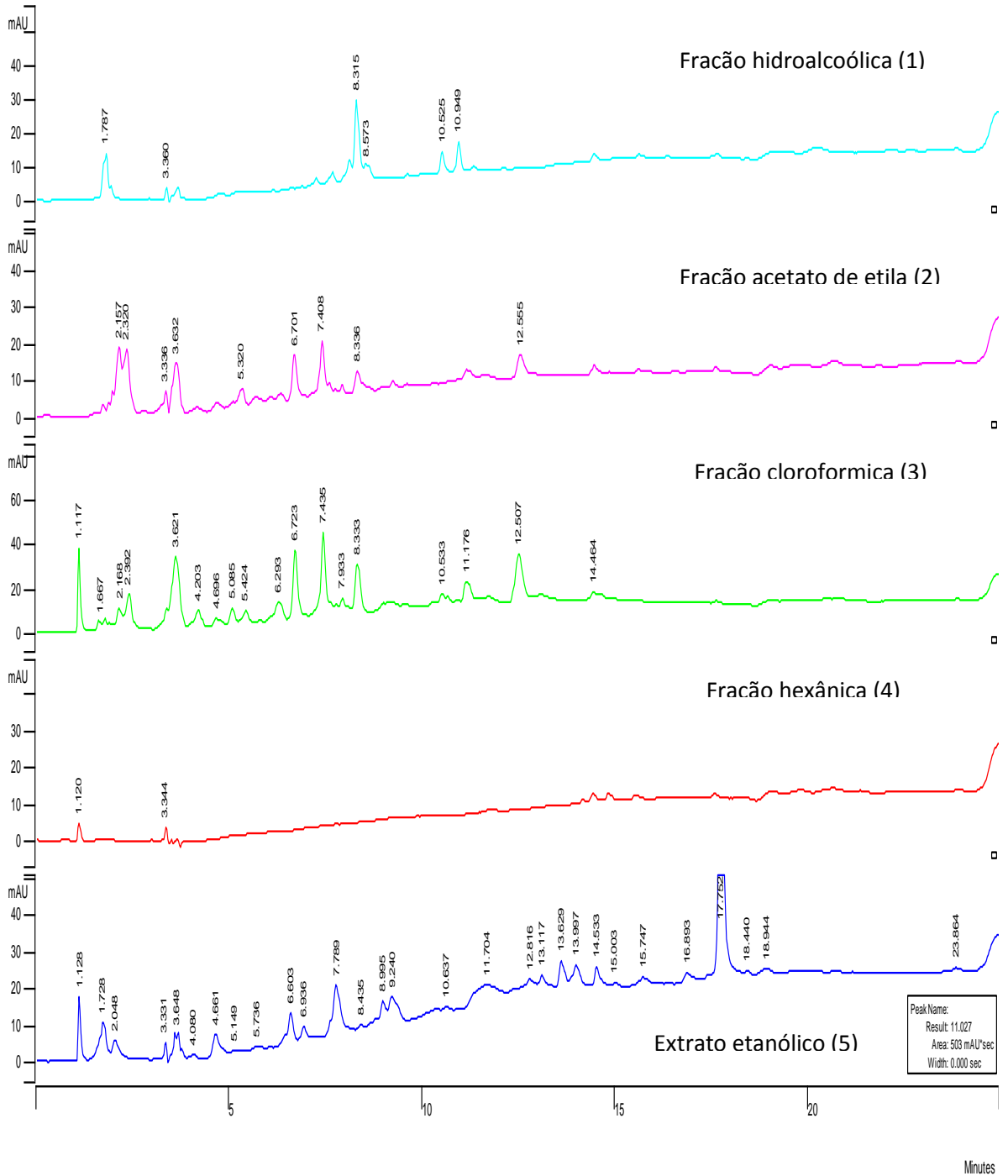


Figura 9: Cromatograma (254 nm) das frações hidroalcoólica (1), Acetato de etila (2) Cloroformica (3) hexânica (4) e extrato etanólico (5) via CLAE.

Apêndice G- Ressonância Magnética Nuclear

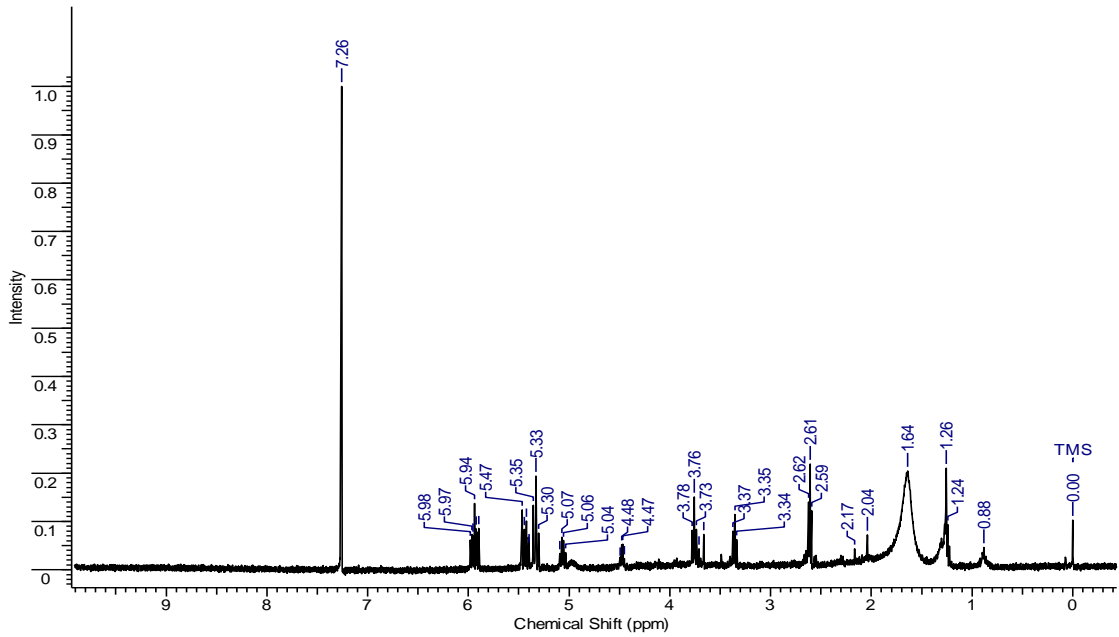


Figura 10: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância da fração acetato de etila (400 MHz, CDCl_3).

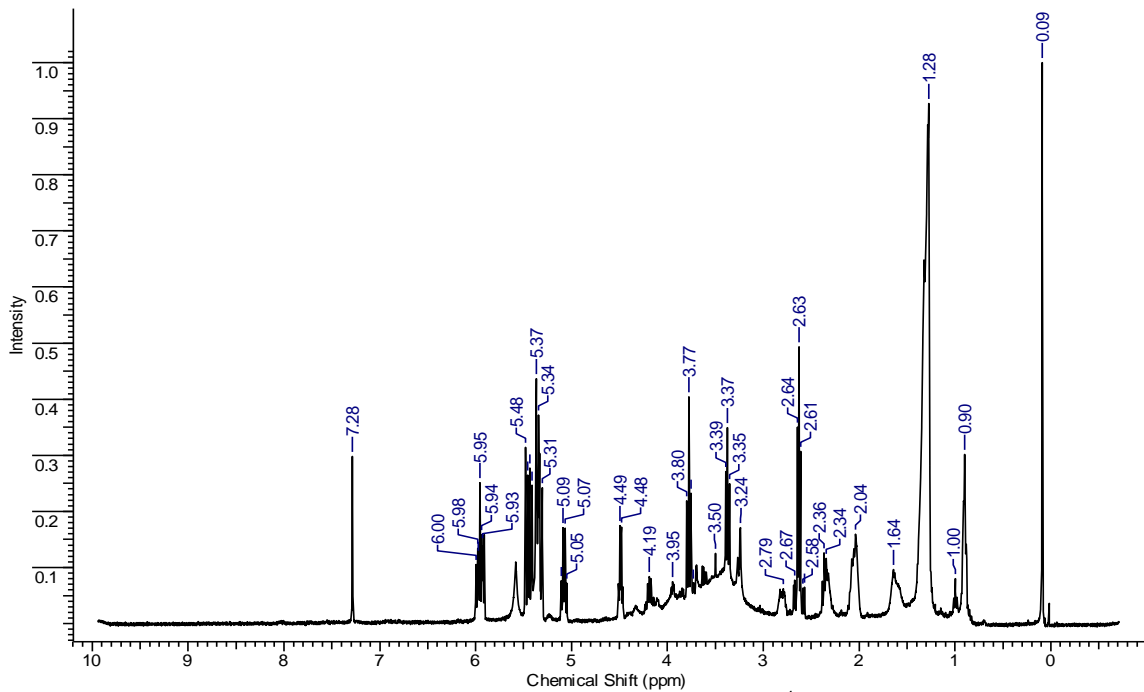


Figura 11: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância da fração clorofórmica (400 MHz, CDCl_3).

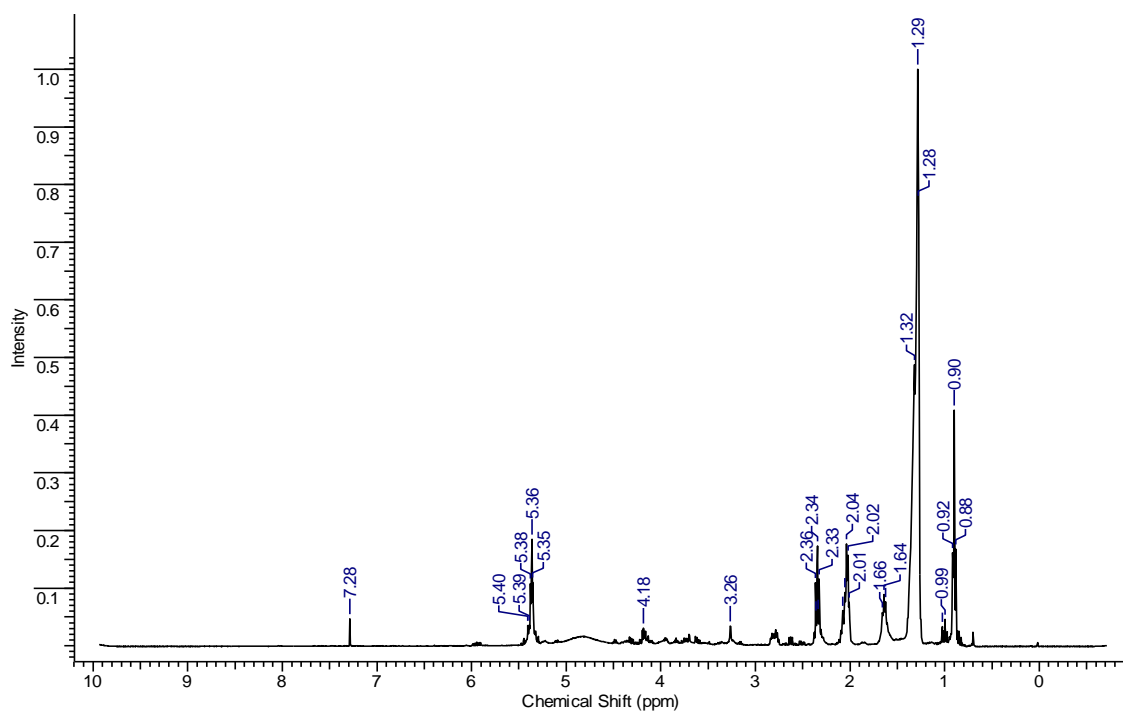


Figura 12: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância do extrato etanólico (400 MHz, CDCl_3).

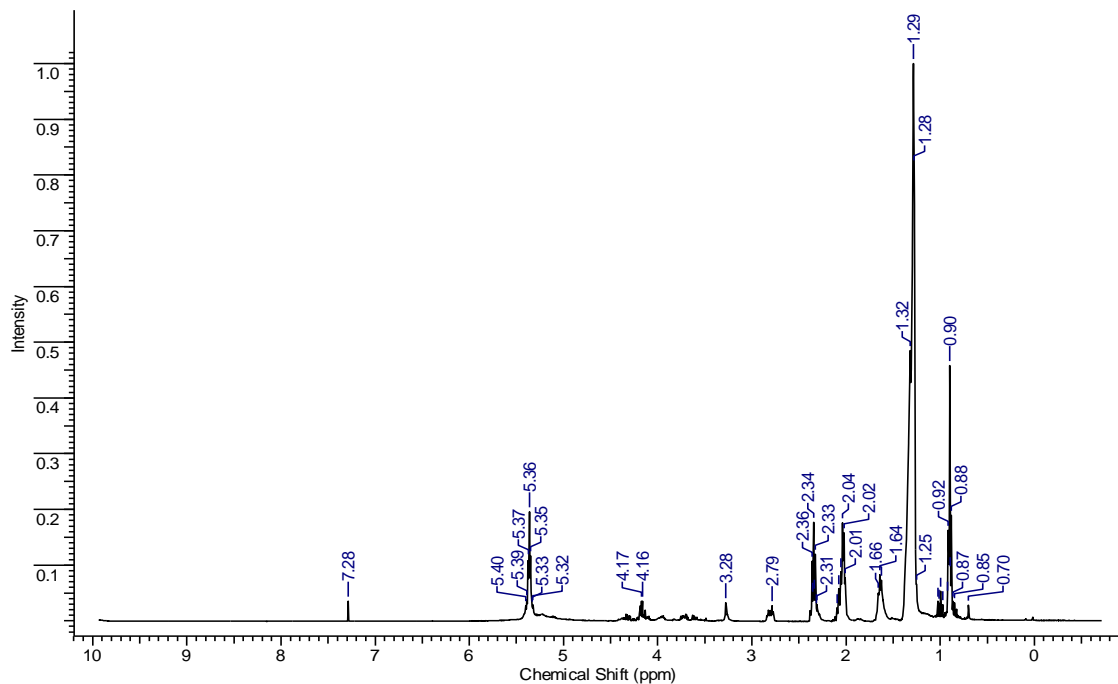


Figura 13: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ^1H da substância da fração hexânica (400 MHz, CDCl_3).

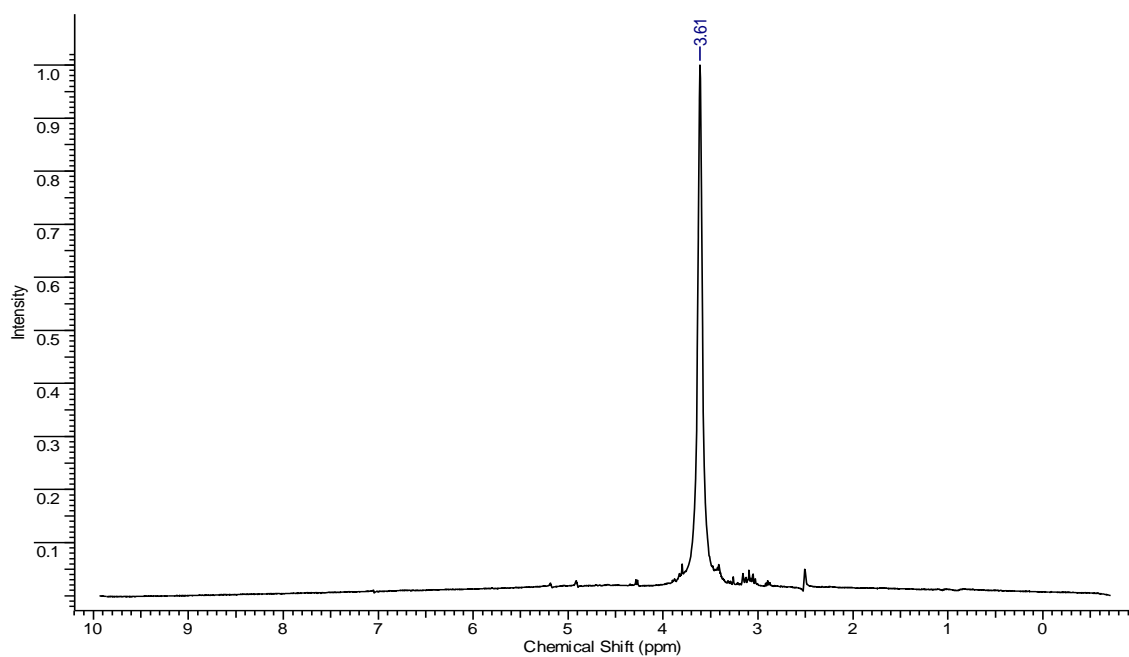


Figura 14: Espectro de Ressonância magnética nuclear de ¹H da substância da fração hidroalcoólica (400 MHz, DMSO-d6).