



EFEITOS DE EXTRATOS ALCALOÍDICOS DA VAGEM DE
ALGAROBA SOBRE OS PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO
RUMINAL *IN VITRO*

JERUZIA VITÓRIA MOREIRA

2014



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

**EFEITOS DE EXTRATOS ALCALOÍDICOS DA VAGEM DE
ALGAROBA SOBRE OS PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO
RUMINAL *IN VITRO***

Autora: Jeruzia Vitória Moreira
Orientadora: Prof^ª. D.Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

ITAPETINGA
BAHIA/BRASIL
2014

JERUZIA VITÓRIA MOREIRA

**EFEITOS DE EXTRATOS ALCALOÍDICOS DA VAGEM DE
ALGAROBA SOBRE OS PRODUTOS DE FERMENTAÇÃO
RUMINAL *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB/*Campus* Juvino Oliveira – Itapetinga/BA, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-orientadora: Daniela Deitos Fries

ITAPETINGA

BAHIA-BRASIL

2014

636.085 Moreira, Jeruzia Vitória
M837e Efeitos de extratos alcoólicos de vagem de algaroba sobre os produtos de fermentação ruminal *in vitro*. / Jeruzia Vitória Moreira. - Itapetinga: UESB, 2014.
64f.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB/*Campus* Juvino Oliveira – Itapetinga/BA, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Mestre em Zootecnia. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira e co-orientação da Prof^a. D.Sc. Daniela Deitos Fries.

1. Extratos de vagem de algaroba - Técnica *in vitro*. 2. Aditivo fitogênico.
3. Fermentação ruminal *in vitro*. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Fries, Daniela Deitos. IV. Título.

CDD(21): 636.085

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Extratos de vagem de algaroba - Técnica *in vitro*
2. Aditivo fitogênico
3. Fermentação ruminal *in vitro*

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA - PPZ
Área de Concentração: Produção de Ruminantes

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Efeito de Extratos Alcaloídicos da Vagem de Algaroba sobre os Produtos de Fermentação Ruminal *in vitro*".

Autor (a): Jeruzia Vitória Moreira

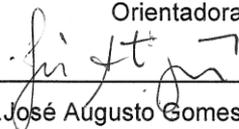
Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Daniela Deitos Fries

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



Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira – UESB
Orientadora



Prof. Dr. José Augusto Gomes Azevedo – UESC



Prof. Dr. Ronan Batista – UFBA

Data de realização: 28 de março de 2014.

DEDICO...

*Ao meu pai, Antônio Nascimento Moreira, pelo esforço da minha formação, dedicação
carinho e exemplo de vida;*

À minha irmã Damiana Vitória;

*A Miguel Araújo, por estar sempre ao meu lado, por ter aceitado minhas necessidades
de ausência, mesmo com muitas saudades;*

*Aos meus sobrinhos, Jorge Henrique e Felipe, minha prima Maria José e demais
familiares que estiveram na torcida e incentivaram;*

À minha família, por tudo;

À prof^a Mara Lúcia, pelas amizades e ensinamentos passados nessa etapa.

Esta conquista é nossa!

Aprendi que o tempo cura... Que a mágoa passa... Que a decepção não mata. Que hoje é reflexo de ontem... Que os verdadeiros amigos permanecem... Que os falsos, graças a Deus vão embora. E que a dor fortalece. Aprendi que sonhar não é fantasiar. Que a beleza não está no que vemos, e sim no que sentimos. E que viver, é simplesmente sensacional!!!

“Que não se tenha pressa, mas que não se perca tempo”.

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado todo e qualquer tipo oportunidade de alcançar meus objetivos e chegar até aqui. Pois acredito que existe uma força maior que nos guia para seguir sempre no caminho certo;

Ao meu pai, **Antônio Nascimento Moreira**, pela compreensão e amor incondicional recebido durante todo o tempo, nunca medindo esforços para que eu pudesse seguir meus projetos, e à minha mãe, **Maria Barbosa Vitória**, que, mesmo distante, tenho a certeza que sempre torceu por mim;

À minha irmã, **Damiana Vitória Moreira**, e minha prima, **Maria José**, que permaneceram sempre na torcida por mim;

À prof^a **Mara Lúcia Albuquerque Pereira**, pelos ensinamentos, pelo exemplo de profissional, por todo o apoio e incentivo, desde a graduação;

Aos colegas de pós-graduação, que deram aquela força, em especial, à **Edileusa, Taiala, Eli Santana, Thon Jovita e Camilla Portela**, que além da amizade e diversão nos momentos de descontração, sempre estiveram presentes pra socorrer, quando a situação não era das melhores;

À família, especialmente, **Andressa, Tia Selva, Tio Osvaldo e Amanda**, muito obrigada pela grande amizade e confiança que foram construídas, pelo auxílio, apoio e dedicação;

Aos meninos da **UESC**, como **Débora, Brena, Flávio, Jorge, Pablo e Leandro**, que foram presença indispensável para realização dos trabalhos;

Aos meus amigos distantes, mas que sempre me alegraram com belas mensagens, **Regina, Lenimara e Juracy**. Vocês são muito especiais!

Ao meu namorado **Miguel**, pelo amor, compreensão e companheirismo, sempre dedicado a mim, especialmente, por acreditar que tudo seria possível;

À **Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia** e ao **Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**, pela oportunidade de realização deste curso;

À **CAPES** – pela concessão da bolsa;

À **FAPESB** – pela concessão financeira para as atividades experimentais;

À co-orientadora, D.Sc. **Daniela Deitos Freis**, pela confiança;

Ao professor **José Augusto Azevedo**, que disponibilizou o laboratório de Nutrição Animal para realização das análises, sempre presente e disposto a ajudar e contribuir nas pesquisas;

Aos **professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia**, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos;

Aos **membros do colegiado do Programa de Pós-graduação** em Zootecnia (PPZ) da UESB;

Às **secretárias do colegiado do PPZ**, por estarem sempre dispostas a nos ajudar;

À **Beatriz, Leile Daiane e Eli Santana**, pela amizade e companhia pelos longos 7 anos;

Aos amigos, **Abdias, Thon, Andréa, Milena, Alana, Leandro Sampaio, Leandro Borges, Lizziane, Gilka, Daiane Alencar, Aline, Zé Queiroz, Alex Schio, Gonçalo, Lucas Oliveira, Pâmalla, Daniel...** Muito obrigado pela colaboração, pela amizade e confiança, que foram construídas durante todo percurso;

A todos os meus familiares colegas e amigos pela torcida, pelo apoio e incentivo durante toda essa caminhada. Enfim, agradeço a todos que colaboraram para a realização deste sonho.

A todos, meu muito obrigada!!!

BIOGRAFIA

JERUZIA VITÓRIA MOREIRA, nascida em Valença - Bahia, em 09 de junho de 1980, filha de Antônio Nascimento Moreira e Maria Barbosa Vitória. Concluiu curso técnico em agropecuária concomitante com o ensino médio pela Escola Média de Agropecuária Regional da Ceplac – EMARC – Valença – BA.

Ingressou na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) no ano de 2007, cursando Zootecnia na turma 2006.2, sendo o mesmo concluído em 2011. Logo em seguida, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia – Mestrado em Zootecnia – Concentração em Produção de Ruminantes pela mesma universidade.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	Ix
Abstract.....	x
I – Referencial Teórico.....	01
1 Introdução.....	01
1.1 Substratos incubados <i>in vitro</i>	01
1.2 Algaroba e seus alcaloides.....	02
1.3 Ionóforos e relações sintróficas no rúmen.....	05
1.4 Alcaloide de algaroba e monensina como modificadores da fermentação ruminal.....	07
II - Referências.....	10
Objetivos Gerais.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	18
Resultados e Discussão.....	28
Conclusões Finais.....	47
Considerações Finais.....	48
Referências.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Fracionamento ácido-base do extrato etanólico para isolamento de alcaloides.....	19
FIGURA 2. Placa de cromatografia com reagente de Dragendorff revelador de alcaloides.....	20
FIGURA 3. Tubo com solução reagente de Mayer revelador de alcaloide.....	20
FIGURA 4. HPLC-MS do extrato alcaloídico I de vagem de <i>Prosopis juliflora</i>	29
FIGURA 5. HPLC-MS do extrato alcaloídico II de vagem de <i>Prosopis juliflora</i>	29
FIGURA 6. Esquema de produção de metano entérico em incubação <i>in vitro</i> sobre a técnica semiautomática de produção de gases.....	41

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Composição química (g/kg matéria seca) dos farelos de vagem de <i>Prosopis juliflora</i> , farelo de trigo e do Tifton 85.....	21
TABELA 2. Tratamentos agrupados de acordo com o substrato.....	22
TABELA 3. Cinética de produção de gases <i>in vitro</i> para o farelo de trigo e feno de Tifton 85 associados a aditivos.....	31
TABELA 4. Parâmetros fermentativos <i>in vitro</i> com extratos alcaloídicos de <i>Prosopis juliflora</i> e monensina, no período de 12 horas de incubação.....	36
TABELA 5. Parâmetros fermentativos <i>in vitro</i> com extratos alcaloídicos de <i>Prosopis juliflora</i> e monensina, no período de 24 horas de incubação.....	39
TABELA 6. Concentração de AGCC e ácido lático <i>in vitro</i> com extratos alcaloídicos de <i>Prosopis juliflora</i> e monensina, no período de 12 horas de incubação.....	42
TABELA 7. Concentração de AGCC e ácido lático <i>in vitro</i> com extratos alcaloídicos de <i>Prosopis juliflora</i> e monensina, no período de 24 horas de incubação.....	44

RESUMO

MOREIRA, J.V. **Análise do processo fermentativo da microbiota ruminal utilizando extrato alcaloídico de *Prosopis juliflora***. Itapetinga-BA, 2014. 64p. (Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Produção de Ruminantes).

Foram estudados os efeitos da associação de extratos alcaloídicos de *Prosopis juliflora*, produzidos por diferentes metodologia de extração e monensina sódica sobre cinética de produção de gases, mitigação de metano, degradabilidade aparente da matéria seca, pH e concentração de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos de cadeia curta, utilizando farelo de trigo e feno de Tifton 85 como substrato, através da técnica de fermentação *in vitro*. Foi utilizado delineamento inteiramente casualizado (DIC); o experimento foi constituído de dois aditivos naturais de vagem de algaroba (extrato alcaloídico I e extrato alcaloídico II) com três níveis cada um e monensina sódica, com três repetições, para produção de gases, e duas repetições, para avaliação dos parâmetros da fermentação *in vitro*. A cinética de gases e a produção de metano foram analisadas através da técnica *in vitro* semiautomática. As leituras de pressão dos gases foram realizadas às 01; 02; 03; 04; 06; 08; 10; 12; 18; 24; 36; 48; 54; 60; 72 e 96 horas, após o início das incubações, e as leituras de pressão dos gases (psi) foram estimadas por intermédio de um transdutor de pressão. Dentre os dois aditivos naturais, o extrato alcaloídico I foi o que apresentou, através da HPLC-MS, maior concentração de alcaloides e também evidenciou resultados semelhantes na mitigação de metano com a monensina. A adição de extrato alcaloídicos de algaroba e monensina nos substratos incubados influenciou ($P < 0,05$) na concentração do volume final de carboidratos fibrosos na cinética de gases. O pH manteve numa faixa ideal de rúmen (6,5 a 7,0) para degradação da MS, não houve diferença ($P > 0,05$) na degradabilidade aparente da matéria seca para os aditivos testados. A concentração de N-NH₃ no fluido incubado obteve efeito ($P < 0,05$) pelo uso de aditivos naturais. O N-NH₃ no período de 12 e 24 h foram semelhantes, indicando eficiência na utilização de nitrogênio pelas bactérias. Houve efeito ($P < 0,05$) sobre as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta. Os extratos de *Prosopis juliflora* possuem princípio ativo com eficiência para seletividade da microbiota ruminal, porém, é preciso determinar uma metodologia de extração de alcaloides que elimine resíduos e interferentes.

Palavras-chave: aditivo fitogênico, ionóforo, mitigação de metano, técnica *in vitro*.

*Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, D.Sc., UESB e Co-orientador: Daniela Deitos Fries, D.Sc., UESB.

ABSTRACT

MOREIRA, J.V. **Análise do processo fermentativo da microbiota ruminal utilizando extrato alcaloídico de *Prosopis juliflora***. Itapetinga-BA, 2014. 64p. (Dissertation - MSc in Zootechny - Production of Ruminants).*

The effects of the combination of *Prosopis juliflora* of alkaloid extracts produced by different methods of extraction and monensin on kinetics of gas production, methane mitigation, apparent degradability of dry matter and pH ammonia concentration and short-chain fatty acids were studied using wheat bran and Tifton 85 hay as substrate using the technique of in vitro fermentation. Completely randomized design (CRD) was used, the experiment consisted of two natural additives mesquite pods (of alkaloid I extract and of alkaloid II extract) with three levels each and monensin, with three replicates for gas production and two replicates for evaluation of the parameters of fermentation in vitro. The kinetics of gases and methane were analyzed by semi-automated in vitro technique. The gas pressure readings were taken at 01, 02, 03, 04, 06, 08, 10, 12, 18, 24, 36, 48, 54, 60, 72 and 96 hours after the start of incubation and pressure gas readings (psi) were estimated by means of a pressure transducer. Of the two natural additives alkaloid of extract I showed the HPLC - MS through the highest concentration of alkaloids and also showed same results in the mitigation of methane with monensin. Adding alkaloid mesquite extract and incubated in monensin substrates influenced ($P < 0.05$) the concentration of the final volume of fibrous carbohydrates in the kinetics of gases. The pH remained an ideal range rumen (6.5 to 7.0) for DM degradation; there was no difference ($P > 0.05$) on apparent dry matter degradability for the additives. The concentration of $\text{NH}_3\text{-N}$ in the incubated fluid obtained effect ($P < 0.05$) by the use of natural additives. The $\text{NH}_3\text{-N}$ in the period from 24:24 h was same indicating efficient use of nitrogen by bacteria. There was an effect ($P < 0.05$) on concentrations of short chain fatty acids. The extracts of *Prosopis juliflora* have active ingredient efficiently to selectivity of ruminal microbial, but you need to determine a methodology for extraction of alkaloids and eliminate waste and interfering.

Key words: phytobiotic additive, ionophore, mitigation of methane, in vitro technique.

*Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, *D.Sc.*, UESB e Co-orientadora Daniela Deitos Fries, *D.Sc.*, UESB.

I - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A qualidade nutricional de uma dieta e quais cepas bacterianas ruminais é mais ativa na fermentação dos nutrientes alimentares é necessário para predizer a quantidade de fontes energéticas e proteica que estão disponíveis no rúmen e evitar desperdício de energia principalmente por rotas metabólicas que venham ser negativo para o ambiente como o metano nos sistemas de produção.

O hábito alimentar dos ruminantes é caracterizado por uma série de eventos peculiares à espécie, que permite a esses animais obter energia a partir de fontes de carboidratos da parede celular das plantas de forma distinta aos demais herbívoros.

Dentre os microrganismos do rúmen, as bactérias são as espécies presentes em grande quantidade e diversidade de espécies, sendo classificadas de acordo com o substrato utilizado para obter energia; grande parte das espécies atua na digestão dos carboidratos fibrosos. Após o processo de digestão de carboidratos e proteína, através da fermentação microbiana, resulta em produtos metabólitos, utilizados como principais fontes de nutrientes para o ruminante.

Dentre os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), produzidos através da fermentação, o acético, propiônico e butírico são os principais. Entretanto, na formação do ácido acético e butírico, é liberado no ambiente ruminal quantidade significativa de H^+ , considerado resíduo do processo fermentativo, e o ruminante apresenta ineficiências em metabolizar, neste caso, entram as cepas de *Archaea* metanogênicas, que utilizam os H^+ e transformam CH_4 , que junto com o CO_2 são responsáveis pela perda de aproximadamente 12% de energia da dieta.

1.1 Substratos incubados *in vitro*

O trigo (*Triticum aestivum*) representa mais de 90% da produção mundial, sendo a espécie genericamente cultivada no Brasil (MIRANDA, 2006). O grão de trigo é o

único cereal que rivaliza com o milho, tanto em volume produzido anualmente no mundo como em valor nutritivo. Ele é um pouco mais rico que o milho em proteína bruta, com 11% e, sendo altamente degradável no rúmen e utilizada com eficiência por ruminantes consumindo forragens de baixa qualidade, porém, é deficiente em lisina e, como outra vantagem, contém menos gordura, cerca de 2%.

Após o processo industrial para fazer os produtos destinados ao mercado de consumo humano, sobram cerca de 30 a 30% de resíduos, considerados subprodutos, composto principalmente por casca, células da aleurona e parte do germe, resultando num subproduto com teor energético elevado e bom teor proteico, que são destinados a vários setores, inclusive para produção animal.

O Feno de Tifton 85 (*Cynodon* cv.) é originário da África, nas regiões do Quênia, Uganda, Tanzânia e Angola. As plantas do gênero *Cynodon* são apropriadas para a produção de feno, por apresentarem morfologia adequada, principalmente haste fina e folhas bem aderidas ao colmo (ATAÍDE JÚNIOR et al., 2000).

As forrageiras do gênero *Cynodon* têm se mostrado promissoras, destacando-se o Tifton 85 pelas suas características de elevado potencial para produção de matéria seca, alta digestibilidade e boa aceitação pelos animais. Adaptam-se à grande diversidade de solos, com preferência aos levemente úmidos e bem drenados. É uma forrageira com boa resistência à seca e que suporta bem as queimadas, e apresentam alta palatabilidade e digradabilidade. Estas plantas não apresentam nenhum fator tóxico. Apresenta ótimas condições de estabelecimento e formação de piquetes, quando bem manejado, indicado para fornecer no cocho na forma de feno, para pastejo de equídeos, bezerros, ruminantes de pequeno porte e vacas de produção.

1.2 Algaroba e seus alcaloides

A algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) é uma leguminosa arbórea, não oleaginosa, da família Fabaceae, a qual foi introduzida no Brasil há mais de 50 anos, estando bastante difundida na região Nordeste, em populações cultivadas e subspontâneas, sendo considerada atualmente como planta invasora do bioma Caatinga. Ocorreu naturalmente no México, América Central e norte da América do Sul (Peru, Equador, Colômbia e Venezuela). Além das regiões de origem, foi introduzida

para cultivos de forragem e madeira no Brasil, Sudão, Sahel Africano, África do Sul e Índia.

Prosopis juliflora pode atingir até 18 m de altura e apresenta um sistema radicular axial ou pivotante, capaz de alcançar grandes profundidades em busca de água e nutrientes. O caule é retorcido, espinhoso e de ritidoma (casca) grossa e coloração pardo-avermelhado. As folhas são compostas bipinadas, inflorescências em espigas axilares, hermafroditas, de coloração branca-esverdeada, medindo cerca de 14 cm de comprimento (NASCIMENTO, 2008). Os frutos, denominados de vagens, são secos, indeiscentes e variam muito quanto à forma, peso e tamanho. A vagem apresenta exocarpo delgado, mesocarpo carnoso, endocarpo fibroso e sementes duras. A polpa possui cerca de 40% de sacarose e o endocarpo, 41% de celulose. As vagens, quando maduras, são amarelas e caem ao solo, ocasião em que apresentam cerca de 10% de umidade. Cada fruto possui, em média, 20 sementes. As sementes são de acentuada dureza e protegidas por um invólucro fibroso, achatadas, ovaladas, lustrosas e marrom-claras (OLIVEIRA et al., 1999).

As vagens de *P. juliflora* são caracterizadas por conterem elevado teor de açúcar (aprox. 30% da matéria seca) e proteína (aprox. 12%), o que vem tornando-as úteis na alimentação humana e animal por milhares de anos, principalmente nas regiões áridas e semiáridas do mundo (FELKER, 1981). Atualmente, no Brasil, a produção anual de vagem *in natura* no nordeste brasileiro pode variar de 0,6 a 1,1 milhão de toneladas, concentrando-se inteiramente nessa região (SILVA et al., 2002). Estima-se uma produtividade média de frutos de 6 toneladas/ha/ano, dependendo da zona bioclimática em que são cultivados e manejados os algarobais; aos 15 anos de idade, podem apresentar uma produção média acima de 70 kg de vagens por árvore (RIBASKI et al., 2009).

Numerosos constituintes químicos nas classes de flavonoides, alcaloides piperidínicos e glicosídeos de ácido elágico foram isolados de *P. juliflora*, notadamente das suas raízes, caules e folhas (SHARMA et al., 1964; BHARDWAJ et al., 1980; SHUKLA et al., 1981; MALHOTRA & MISRA et al., 1981; AHMAD et al., 1989b; AQEEL et al., 1989; SATISH et al., 1999, NAKANO et al., 2004a,b). Extratos e alcaloides piperidínicos, a partir de folhas de algaroba, mostraram atividade antimicrobiana contra várias bactérias gram-positivas e fungos (AHMAD et al. 1989a;

AHMAD et al., 1989b; AQEEL et al., 1989; SATISH et al., 1999; KANTHASAMY et al., 1988; CÁ CERES et al., 1995; AHMAD, 1991).

No grupo de alcaloides encontrados em *Prosopis juliflora*, destacam-se como componentes principais a julifloricina, juliprosopina, juliprosina, juliprosineno, juliflorinina e isojuliprosina (TABOSA et al., 2000). Extratos das sementes e folhas de *Prosopis juliflora* demonstraram diversos efeitos farmacológicos *in vitro* como propriedade antibacteriana (AQEEL et al., 1989; SATISH et al., 1999), antifúngica (AHMAD et al., 1989a; KAUSHIK et al., 2002) e anti-inflamatória (AHMAD et al., 1989b). Estas propriedades foram atribuídas à presença destes alcaloides (AHMAD et al., 1989a,b). Em estudo realizado por Mazzuca et al. (2003), avaliando o extrato de três espécies de *Prosopis*, verificaram que todos os extratos obtidos com éter apresentavam atividade antibacteriana. Os alcaloides têm sido efetivos contra as bactérias gram positivas e exibem pouca ou nenhuma atividade contra as gram negativas, e assim, estes compostos derivados de plantas incorporados às dietas de ruminantes têm o intuito de promover melhor desempenho e melhor qualidade dos produtos obtidos desses animais.

Apenas quatro estudos fitoquímicos das vagens de algaroba estão disponíveis na literatura (BATATINHA et al., 1997; TABOSA et al., 2000; HUGHES et al., 2006; SINGH et al., 2011), e apenas um relata a avaliação antimicrobiana de seus extratos (SINGH et al., 2011). Um estudo preliminar realizado por Batatinha (1997), utilizando a técnica RUSITEC (Rumen Simulation Technology), indicou que um extrato alcaloídico das vagens aumentou a quantidade de tiamina, tiaminadifosfato, tiaminamono fosfato, proteínas, ácidos propiônico e n-valérico, após 23 dias de fermentação, enquanto a produção de metano, ácidos acético e i-valérico diminuíram na maior concentração deste extrato.

Em estudos realizados por Argôlo et al. (2010), alguns parâmetros de fermentação ruminal foram avaliados em cabras alimentadas com níveis de farelo de vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) e foi evidenciado que houve redução da razão acetato/propionato no líquido ruminal, e que o fluxo intestinal de compostos nitrogenados microbianos decresceram linearmente com o aumento dos teores de farelo de algaroba nas dietas, sem que houvesse alteração no consumo de matéria seca e produção de leite. Nesse mesmo estudo, as dietas contendo 33,3% e 66,6% de farelo de vagem de algaroba, em substituição ao milho, atenderam às exigências por energia

metabolizável das cabras lactantes, sendo seu consumo superior ao da dieta composta somente de milho como principal fonte de energia.

Aqeel et al. (1989) estudaram a atividade antimicrobiana da julifloricina isolada da *P. juliflora*, sobre 40 microrganismos incluindo bactérias, fungos dermatófitos, duas espécies de *Candida* sp. e vírus, e encontraram efeito inibitório significativo sobre as bactérias gram-positivas e as espécies de *Candida* sp., comparativamente a antibióticos e antifúngicos sintéticos.

De acordo com Aqeel (1991), os alcaloides da *P. juliflora* inibem o crescimento de bactérias gram-positivas, grupo ao qual pertence a maioria das bactérias fibrolíticas do rúmen e que compartilham semelhanças estruturais com a parede celular de arqueas metanogênicas, principais responsáveis pela produção de CO₂ e metano, respectivamente.

De acordo com Chourday et al. (2005), as propriedades anfotéricas dos alcaloides se devem aos anéis indólicos e heterocíclicos, que conferem caráter polar, e o apolar deve-se às longas cadeias de carbono. Esta dupla polaridade pode promover um efeito desorganizador da membrana celular, alterando o transporte de íons e outras importantes substâncias, resultando em morte celular, quando em altas concentrações. O mecanismo de ação dos alcaloides da *P. juliflora* consiste na atividade citotóxica gerada pelo bloqueio dos canais de cálcio da membrana celular, o que caracteriza sua propriedade de ionóforo.

1.3 Ionóforos e relações sintróficas no rúmen

Os ionóforos são compostos de baixo peso molecular que afetam certos microrganismos seletivamente pela alteração da passagem de íons através dos canais da membrana de bactérias gram-positivas. De forma bastante resumida, sua ação no rúmen leva ao aumento da população de bactérias gram-negativas, elevando a produção de ácido propiônico, e à diminuição da degradabilidade ruminal de proteína. O ácido propiônico aumenta o aporte total de energia para o animal hospedeiro, enquanto a diminuição da degradabilidade ruminal da proteína aumenta o fluxo de proteína metabolizável para o intestino delgado. Essas ações resultam em maior eficiência no aproveitamento, tanto da energia quanto da proteína da dieta. O aumento na eficiência de aproveitamento dos nutrientes resulta em redução no consumo de matéria seca em

até 16%, em dietas ricas em concentrado; aumento no consumo de dietas ricas em forragem; e diminuição na produção de CH₄, como resultado da inibição de bactérias produtoras de hidrogênio. Devido ao fato de antibióticos ionóforos não inibirem crescimento de arqueas metanogênicas, a menor produção de CH₄, provavelmente, deve-se à redução nos precursores (H₂ e formato) (HOOK et al., 2009). Isso é suportado pela observação de que, quando substratos (CO₂ e H₂) foram fornecidos, ionóforos não afetaram a produção de CH₄. Entretanto, destaca-se que a monensina inibiu a metanogênese a partir de formato.

Em geral, antibióticos ionóforos são inibitórios para bactérias gram-positivas, tais como *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Streptococcus* e, para aquelas que frequentemente apresentam coloração de gram-negativas, mas possuem estrutura de parede celular de gram-positivas, tais como *Butyrivibrio*, *Lachnospira* e *Ruminococcus*. Bactérias gram-negativas, tais como espécies de *Bacteroides*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Succinomonas*, *Succinivibrio* e *Veillonella*, são resistentes a ionóforos. Baseando-se nos principais produtos de fermentação, bactérias que produzem ácido láctico, ácido butírico, ácido fórmico ou hidrogênio são susceptíveis, e bactérias que produzem ácido succínico ou propiônico são resistentes a antibióticos ionóforos (NAGARAJA et al., 1997).

Os efeitos de ionóforos sobre a digestão de fibra têm sido estudados em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Geralmente, estudos *in vitro* mostram inibição que varia de moderada a elevada. Fatores que afetam a inibição da degradação da fibra incluem o tipo de forragem e a fonte de inóculo ruminal, se proveniente de animais adaptados ou não (NAGARAJA et al., 1997).

Fibrobacter succinogenes é a bactéria fibrolítica com estrutura de parede celular gram-negativa mais abundante no rúmen e é essencial para produção indireta de propionato, pois não produz hidrogênio, mas succinato e formato como produtos finais de degradação. A degradação de celulose por *F. succinogenes* segue diferente modo de ação relativo às bactérias *Ruminococcus*, agindo sobre a parede celular do alimento, produzindo acetato e succinato em sequências acopladas. Como a atividade da enzima hidrogenase não é sensível à tensão provocada pelo acúmulo de hidrogênio, *F. succinogenes* não vive em relação sintrófica com metanogênicas como *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens*. Entretanto, as metanogênicas utilizam o hidrogênio

produzido por *F. succinogenes*, o qual é disponível como resultado de transferência interespecífica de hidrogênio.

O aumento da proporção molar de propionato é acompanhado por uma redução na quantidade de metano produzido no rúmen. A extensão desta redução varia de 4 a 31%, e a inibição de produção de metano pode ser responsável por um terço de melhoria na utilização de energia em animais alimentados com ionóforo. Devido ao fato de antibióticos ionóforos não inibirem crescimento de arqueas metanogênicas, a redução provavelmente deve-se à redução nos precursores (H_2 e formato) (NAGARAJA et al., 1997; HOOK et al., 2009). Isso é suportado pela observação de que, quando os substratos (CO_2 e H_2) foram fornecidos, ionóforos não afetaram a produção de metano, mas inibiram, por outro lado, a metanogênese a partir de formato.

1.4 Alcaloides de algaroba e monensina como modificadores da fermentação ruminal

Uma análise preliminar de extrato alcaloídico de vagens de algaroba por RMN de 1H (400 MHz) foi realizado (SANTOS et al., 2013). O espectro de RMN 1H do extrato mostrou sinais em δ 6,2 (s, H-7'''), δ 3,9 (sl, H-3 e 3'), δ 3,7 (d, $J = 11$ Hz, H-5'''' eq), δ 2,7 (m, H-6 e 6') e δ 1,3 (m, H-7 e H-7'), de acordo com a presença de juliprosopina (também conhecido como juliflorina) como seu principal constituinte (OTT-LONGONI et al., 1980; TABOSA et al., 2000). Desde que o extrato enriquecido de alcaloide, obtido de vagens de *P. juliflora*, foi mostrado, exibiu propriedades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas (SANTOS et al., 2013), que podem ter certas semelhanças estruturais de parede celular de *Archaea*, principais responsáveis pela produção indesejada de CO_2 e CH_4 durante a digestão ruminal, respectivamente (CALLAWAY et al., 1999) e, considerando que alcaloides de algaroba promovem alteração de parâmetros ruminiais durante um estudo preliminar *in vitro* (BATATINHA, 1997), o próximo passo foi avaliar a influência do extrato sobre a digestão ruminal por meio da técnica semiautomática de produção de gases *in vitro* e comparar seus efeitos com os de monensina, um antibiótico ionóforo que inibe seletivamente o crescimento microbiano ruminal (SANTOS et al., submetido à publicação). Neste estudo, o extrato clorofórmico básico (ECB) de alcaloides, cujo principal constituinte é juliprosopina (juliflorina), apresentou atividade antibacteriana para bactérias gram-positivas:

Micrococcus luteus [Concentração Inibitória Mínima (MIC)=25 µg/ml], *Staphylococcus aureus* (MIC = 50 µg/ml) e *Streptococcus mutans* (MIC=50 µg/ml). Os resultados também mostraram que ECB 100 mg/L inibiu de forma mais eficaz a produção de gases com um mínimo de 6 ml/100 mg de matéria seca com 30 h de fermentação, enquanto monensina proporcionou uma produção não acumulada de 11,7 ml/100 mg de matéria seca. A produção acumulada de gases sofreu redução de 21% na presença de 100 mg/L de ECB em relação ao controle e à monensina utilizada na concentração recomendada pelo fabricante. A degradabilidade verdadeira da matéria seca foi menor com a concentração de 200 mg/L de ECB no tempo de incubação de 36 h. Por fim, apenas monensina elevou a produção de massa microbiana em 18 h, que foi reduzida em 36 h de incubação. Considerando que ECB a 50 mg/L foi suficiente para causar inibição significativa do crescimento microbiano e ao mesmo tempo diminuiu a produção de gases, este extrato rico em alcaloides de algaroba pode ser utilizado como aditivo para modificar a fermentação e diminuir a produção CH₄ e CO₂ durante a digestão no rúmen.

A implementação de práticas de manejo na pecuária, visando melhorar a produtividade animal, como, por exemplo, a redução da emissão de CH₄, é de grande relevância para os sistemas de produção animal e preservação do meio ambiente. O uso de leguminosas na dieta, visando redução da produção de CH₄ no rúmen, tem sido pesquisado com estudos *in vivo* e *in vitro* em ruminantes consumindo baixos ou moderados teores de taninos (PUCHALA et al., 2005). Leveduras também são relacionadas à redução da produção de CH₄ no rúmen por promover aumento da competição com bactérias acetogênicas e arqueas metanogênicas (POSSENTI et al., 2008). Estes estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo principal de encontrar uma substância natural que possa substituir o uso de antimicrobianos sintéticos como aditivos em rações de animais, utilizados também como promotores do crescimento e que promovam a redução da emissão de CH₄ pelos ruminantes. Entretanto, é importante destacar que nenhum estudo técnico ou científico encontra-se disponível na literatura, que utiliza o extrato alcaloídico de algaroba (*Prosopis juliflora*) como aditivo na alimentação desses animais para a diminuição da emissão de gás CH₄, escopo tecnológico que este projeto visa desenvolver.

Assim, pode-se inferir que os alcaloides extraídos de *P. juliflora* podem atenuar a produção de metano por desestabilizar as relações sintróficas entre comunidades microbianas metanogênicas e bactérias fibrolíticas, que compartilham estrutura de

parede celular de bactérias gram-positivas. Estes resultados demonstram a potencialidade do uso do extrato enriquecido de alcaloide da algaroba na manipulação da fermentação ruminal, cujo efeito redutor na produção de gases pode estar fortemente relacionado à mitigação na produção de metano entérico.

II REFERÊNCIAS

AHMAD, A. Study of antimicrobial activity of the alkaloids isolated from *Prosopis juliflora*. **Thesis, University of Karachi**, Pakistan, p. 447, 1991.

AHMAD, A.; KHURSHEED, A.K.; SABIHA, Q.; VIQARUDDIN, A. Antifungal activity of some hydrosoluble *Prosopis juliflora* alkaloids. **Fitoterapia**, v.60, p.86-89, 1989a.

AHMAD, V.U.; SULTANA, A.; QAZI, S. Alkaloids from the leaves of *Prosopis juliflora*. **Journal of Natural Products**, v.52, p.497-501, 1989b.

AQEEL, A.; KHURSHEED, A.K.; VIQARUDDIN, A.; SABIHA, Q. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. **Drug Research**, v.39, p.652-655, 1989.

ARGÔLO, L. S.; PEREIRA, M. L. A.; DIAS, J. C. T.; CRUZ, J.F.; DEL REI, A.J.; OLIVEIRA, C.A.S. Farello da vagem de algaroba em dietas para cabras lactantes: parâmetros ruminais e síntese de proteína microbiana. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.541-548, 2010.

ATAÍDE JÚNIOR, J. R.; PEREIRA, O. G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S. de C.; CECON, P. R.; FREITAS, E. V. V. de. Valor nutritivo do feno de capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*) em diferentes idades de rebrota, em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 2193-2199, 2000.

BATATINHA, M.J.M. Investigations about toxic influences of *Prosopis juliflora* D.C: (Algarobeira) on cell cultures as well as on the fermentation in the rumen of cattle (in vitro). **Thesis, University of Veterinary Medicine**, Foundation Hannover, Germany, 189 p. 1997.

BHARDWAJ, D.K.; BISHT, M.S.; JAIN, R.K.; SHARMA, G.C. Prosogerin-D, a new flavone from *Prosopis spicigera* seeds. **Phytochemistry**, v.19, p.1269-1270, 1980.

CÁCERES, A.; MENÉNDEZ, H.; MÉNDEZ, E.; COHOBÓN, E.; SAMAYOA, B.E.; JAUREGUI, E. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **Journal of Ethnopharmacol**, v.48, p.85-88, 1995.

CALLAWAY, T.R.; ADAMS, K.A.; RUSSELL, J.B. The ability of “low g + c gram-positive” ruminal bacteria to resist monensin and counteract potassium depletion. **Current Microbiology**., v.39, p.226-230, 1999.

CHOUDHARY, M.I.; NAWAZ, S.A.; ZAHEER-UL-HAQ; AZIM, M.K.; GHAYUR, M.N.; LODHY, M.A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B.M.; ATTA-UR-RAMAN; GILANI, A.H.; AHMAD, V.U. Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking

potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.332, p.1171-1179, 2005.

FELKER, P. Use of tree legumes in semiarid regions. **Society for Economic Botany**, v.35, p.174-186, 1981.

HOOKE, S.E.; NORTHWOOD, K.S.; WRIGHT, D.G.; McBRIDE, B.W. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.374-380, 2009.

HUGHES, J.B.; SILVA, V.D.A.; SILVA, A.R.; SOUZA, C.S.; SILVA, A.M.M.; VELOZO, E.S.; BATATINHA, M.J.M.; COSTA, M.F.D.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R.S.; COSTA, S.L. Cytotoxicity effect of alkaloidal extract from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.50-58, 2006.

KANTHASAMY, A.; SUBRAMANIAN, S.; GOVINDASAMY, S. Bactericidal and fungicidal effects of *Prosopis juliflora* alkaloidal fraction. **Indian Drugs**, v.26, p.390-394, 1988.

KAUSHIK, J.C.; SANJAY, A.; TRIPATHI, N.N. Antifungal properties of some plant extracts against the damping-off fungi of forest nurseries. **Indian Journal of Forestry**, v.25, n.3-4, p.359-361, 2002.

MALHOTRA, S.; MISRA, K. 3,3'-di-O-methylelagic acid 4-O-rhamnoside from the roots of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, v.20, p.2043-2044, 1981.

MAZZUCA, M.; KRAUS, W.; BALZARETTI, V. Evaluation of the biological activities of crude extracts from Patagonian *Prosopis* seeds and some of their active principles. **Journal of Herbal Pharmacotherapy**, v.3, n.2, p.31-37, 2003.

MIRANDA, M.Z. Trigo: Germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Passo Fundo, RS: **Embrapa Trigo**, 2006. 12p.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The rumen microbial ecosystem**, 2nd ed.; Hobson, P.N., Stewart, C.S., Eds; Chapman and Hall, London, United Kingdom, 719p, 1997.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y.; SHIGEMORE, H.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.). **Plant Growth Regulation**, v.44, n.3, p.207-210, 2004b.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; YAMADA, K.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Growth inhibitory alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) leaves. **Phytochemistry**, v.65, n.5, 587-591, 2004a.

NASCIMENTO, C. E. S. - **Comportamento invasor da algarobeira *Prosopis juliflora* (Sw) DC. nas planícies aluviais da caatinga – Universidade Federal de Pernambuco.**

2008. 115 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J.M.E.; CHIAVONE-FILHO, O; MEDEIROS, J.T.N. Study the Conditions of Cultivation of the Algaroba and Jurema Preta and Determination Calorific Power. **Revista de Ciência e Tecnologia**, n.14, p.93-104, 1999.

OTT-LONGONI, R.; VISWANATHAN, N.; HESSE, M. The structure of the alkaloid juliprosopin from *Prosopis juliflora* A. DC. **Helvetica Chimica Acta**, v.63, n.222, p.2119-2129, 1980.

PEREIRA, T.C.J.; PEREIRA, M.L.A.; OLIVEIRA, C.A.S.; ARGÔLO, L.S.; SILVA, H.G.O.; PEDREIRA, M.S.; ALMEIDA, P.J.P.; SANTOS, A.B. Mesquite pod meal in diets for lactating goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.42 no.2, p.102-108 2012.

POSSENTI, R. A.; FRANZOLIN, R.; SCHAMMAS, E.L. et al. Efeitos de dietas contendo *Leucaena leucocephala* e *Saccharomyces cerevisiae* sobre a fermentação ruminal e a emissão de gás metano em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37 n.8, p.1509-1516, 2008.

PUCHALA, R.; MIN, B.R.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, v.83, n.1, p.182-186, 2005.

RIBASKI, J.; DRUMOND, M.A.; OLIVEIRA, V.R.; NASCIMENTO, C.E.S. Algaroba (*Prosopis juliflora*): Árvore de Uso Múltiplo para a Região Semiárida Brasileira. **Colombo, PR**, 2009. (COMUNICADO TÉCNICO, 240).

SANTOS, E.T.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, C.F.P.G. et al. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion, **International Journal of Molecular Science**, v. 14(4), 8496-8516 2013.

SATISH, S.; RAVEESHA, K.A.; JANARDHANA, G.R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.145-147, 1999.

SHARMA, R.C.; ZAMAN, A.; KIDWAI, A.R. Chemical examination of *Daphne papyracea* Wall. **Indian Journal of Chemistry**, v.2, p.509-510, 1964.

SHUKLA, R.V.N.; MISRA, K. Two flavonoid glycosides from the bark of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, v.20, p.339-340, 1981.

SILVA, E. L.; SILVA, J. H. V.; JORDÃO FILHO, J. Valores energéticos e efeitos da inclusão da Farinha Integral de Vagem de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) em rações de poedeiras comerciais. **Revista Brasileira Zootecnia**, v.31, n.6, p.2255-2264, 2002.

SINGH, S.; SWAPNIL, S.K.V. Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research.**, v.2, p.114-120, 2011.

TABOSA, I.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; PAMPLONA, F.V.; ALMEIDA, R.N.; CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; SOUZA, J.C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M. Isolamento biomonitorado de alcaloides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.9-10, n.1, p. 11-22, 2000.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar, por meio da técnica por incubação semiautomática de produção de gases *in vitro*, a utilização de extrato alcaloídico de vagem de *Prosopis juliflora* como aditivo natural, a fim de verificar seus efeitos sobre os produtos resultantes do processo de fermentação ruminal *in vitro*, principalmente, seu potencial de mitigação de metano entérico.

Objetivos específicos:

Avaliar o potencial de utilização da fração alcaloídica de vagens da leguminosa *Prosopis juliflora* (Sw) D.C., com duas formas de extração como aditivo natural para manipulação ruminal, visando à redução de perda de energia e/ ou proteína do sistema ruminal;

Realizar incubação dos extratos alcaloídicos de vagens da *Prosopis juliflora* (Sw) D.C., em três níveis de adição ao meio de incubação, em comparação à monensina sódica com substrato farelo de trigo e feno de Tifton 85, por meio da técnica de produção de gases *in vitro*, para mensurar o volume total de gases produzidos e de metano (CH₄);

Avaliar o efeito dos níveis de extratos alcaloídicos de vagens de *Prosopis juliflora* sobre a taxa de degradação da matéria seca, estabilidade do pH e concentrações de N-NH₃, de AGCC (acetato, Propionato e butirato) e lactato no meio de fermentação ruminal *in vitro*.

CAPÍTULO
PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO*
UTILIZANDO EXTRATOS ALCALOÍDICOS DE ALGAROBA EM
COMPARAÇÃO À MONENSINA SÓDICA

1 INTRODUÇÃO

Desde o século passado, o aumento das concentrações atmosféricas de metano tem sido relatado e isso tem despertado interesse mundial em reduzir as emissões de gases entéricos de efeito estufa na atmosfera. Aproximadamente 15% do total das emissões de CH₄ são produzidos por ruminantes domésticos, durante a sua fermentação digestiva, e liberados no meio ambiente por eructação.

Tipicamente, os ruminantes perdem entre 2-12% da ingestão de energia bruta durante este processo e, também, por esta razão, aditivos alimentares, tais como os ionóforos, são usados para melhorar a eficiência da conversão alimentar por inibição da produção de ácido acético e butírico em favor de ácido propiônico, que é mais energeticamente eficiente e reduz as emissões de CH₄ entérico.

O aumento da proporção molar de propionato é acompanhado por uma redução na quantidade de metano produzido no rúmen. A extensão desta redução varia de 4 a 31%, e a inibição de produção de metano pode ser responsável por um terço de melhoria na utilização de energia em animais alimentados com monensina. Devido ao fato de antibióticos ionóforos não inibirem crescimento de arqueas metanogênicas, a menor produção de metano, provavelmente, deve-se à redução nos precursores (H₂ e formato).

Assim, os empenhos de investigação têm-se situado sobre os métodos para manipular a fermentação do rúmen com intuito de minimizar os aspectos prejudiciais dos produtos finais da fermentação e, ao mesmo tempo, maximizar a degradação da fibra e a conversão de nitrogênio não proteico em proteína da célula microbiana. Recentemente, com base nos riscos de resistência aos antibióticos em seres humanos e na ocorrência de resíduos em alimentos de origem animal, a União Europeia banuiu o uso de antibióticos na pecuária como aditivos alimentares, encerrando quase 50 anos de uso de antibióticos para fins não terapêuticos. Assim, existe uma procura real e crescente

por novos aditivos em alimentos, para substituir esses compostos. Dentro desse contexto, a comunidade científica iniciou esforços para explorar produtos naturais como aditivos alimentares, uma vez que muitos compostos naturais e extratos de plantas compartilham alguns dos benefícios dos antibióticos.

A algarobeira (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) é uma leguminosa arbórea, não oleaginosa, da família Fabaceae, foi introduzida no Brasil há mais de 50 anos, estando bastante difundida na região Nordeste, em populações cultivadas e subespontâneas, sendo considerada atualmente como planta invasora do bioma Caatinga. *Prosopis juliflora* ocorre naturalmente no México, América Central e norte da América do Sul (Peru, Equador, Colômbia e Venezuela). Além das regiões de origem, foi introduzida para cultivos de forragem e madeira no Brasil, Sudão, Sahel Africano, África do Sul e Índia.

As vagens de *Prosopis juliflora* apresentam toxinas e fatores antinutricionais, tais como polifenólicos, alcaloides, lectinas e aminoácidos não proteicos, que podem limitar sua utilização como ração animal. Numerosos componentes químicos, pertencentes às classes de flavonoides, alcaloides piperidínicos e glicosídeos de ácido elágico, foram isolados de *P. juliflora*, notadamente das suas raízes, caules e folhas.

Considerando que vários alcaloides piperidínicos já foram isolados de *P. juliflora*, como a juliprosina, juliprosopina, 3'-oxo-juliprosopina, o secojuliprosopinal, 3-oxo- e 3'-oxo-juliprosina, dentre outros (NAKANO et al., 2004a,b), e que muitos destes alcaloides demonstraram potente ação antimicrobiana, equiparada à ação da benzil-penicilina, gentamicina e trimetropina, contra bactérias gram-positivas (AQEEL et al., 1989; NAKANO et al., 2004b), torna-se interessante a investigação de extratos alcaloídicos de *P. juliflora* como potenciais aditivos na alimentação de ruminantes.

Apenas cinco estudos fitoquímicos das vagens de algaroba estão disponíveis na literatura (BATATINHA et al., 1997; TABOSA et al., 2000; HUGHES et al., 2006; SINGH et al., 2010; SANTOS et al., 2013), e apenas dois relatam a avaliação antimicrobiana de seus extratos (SINGH et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Estudo preliminar, realizado por Batatinha (1997), utilizando um rúmen artificial (RUSITEC - rumen simulation technique), indicou que um extrato alcaloídico das vagens aumentou a quantidade de tiamina, tiaminadifosfato, tiaminamonofosfato, proteínas, ácidos propiônico e n-valérico, após 23 dias de fermentação, enquanto a

produção de metano, ácido acético e i-valérico diminuíram na maior concentração deste extrato.

Santos et al. (2013) utilizaram o extrato clorofórmico básico de vagens de algarobeira, cujos principais constituintes foram a juliflorina, prosoflorina e juliprosina, para avaliar a cinética da degradação do farelo de trigo por meio da técnica de produção de gases *in vitro* e concluíram que o extrato apresenta potencial uso como aditivo nutricional por ter reduzido a produção de gases durante a digestão ruminal, sem afetar a degradabilidade da matéria seca.

No entanto, partindo do pressuposto de que os alcaloides no extrato clorofórmico básico de vagens de algarobeira reagiriam melhor em meio ácido, por possuírem propriedade química de uma base e, como o meio de fermentação no rúmen é próximo ao pH neutro, poderia levar a uma redução na eficácia de sua ação. Além disso, o extrato clorofórmico básico é insolúvel em água, havendo necessidade de se utilizar um solvente orgânico para facilitar seu uso como aditivo.

Nesse contexto, diante das propriedades bioativas da *P. juliflora*, objetivou-se avaliar os efeitos de dois extratos alcaloídicos de suas vagens, utilizando dois protocolos de obtenção em meio aquoso, por meio de acidificação, de forma independente, em relação à monensina (controle positivo) e também em função dos níveis (0; 3,9; 7,9 e 12 ug) de inclusão de cada extrato sobre o processo de fermentação ruminal *in vitro*, principalmente, a disponibilidade de cinética de produção de gases *in vitro* com farelo de trigo e feno de Tifton 85 como substratos e sobre os seus parâmetros fermentativos (degradabilidade da matéria seca, pH, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos de cadeia curta, ácido lático e metano).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-prima vegetal

As vagens maduras de *Prosopis juliflora* foram obtidas no município de Brumado-Bahia-Brasil, foram coletados manualmente, no período de agosto a novembro de 2011. Na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), *campus* Itapetinga-Bahia, as vagens coletadas foram secas ao sol durante três dias. E no laboratório de forragicultura, as vagens foram processadas em um triturador e moídas com peneira de 2 mm para obtenção do farelo de vagens de algarobeira. Logo após, o farelo foi embalado e armazenado em *freezer*. Uma amostra composta por flores, folhas e caule foi alojado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), em Feira de Santana, Bahia, Brasil, sob o código de (RG-14435).

2.2 Obtenção dos Extratos Alcaloídicos

Após a moagem, o farelo foi destinado à produção de extrato alcaloídico.

Extrato alcaloídico I: O farelo da *Prosopis juliflora* (2kg), moída em 1 mm, foi colocada em recipiente cilíndrico de plástico resistente e esterilizado, suspenso por um aro preso ao suporte universal, em seguida, adicionou-se 4 litros de etanol 95% sobre o farelo, e o líquido extraído por gotejamento foi recolhido em erlenmeyer 2000 mL. Após a percolação, a solução extraída foi concentrada a vácuo, a uma temperatura em torno de 65°C, em evaporador rotatório, obtendo, assim, os extratos etanólicos brutos (EE). O aspecto desses extratos era viscoso de coloração castanho-escuro. Confirmação de alcaloides no extrato etanólico (EE) foi realizada diluindo uma gota de extrato em duas gotas de metanol e, com auxílio de um capilar, gotejou levemente na placa de sílica. Em um Becker com solução de 9 mL de clorofórmio e 1 mL de metanol, colocou-se a placa em pé até o extrato reagir, depois secou a placa e borrifou com reagente de Dragendorff. O extrato etanólico (EE) de vagens de algaroba exibiu pontos de Dragendorff positivos, quando submetidos à análise de cromatografia de camada delgada (CCD).

O EE foi submetido ao tratamento ácido-base, de modo a obter extratos enriquecidos com alcaloides, de acordo com a metodologia de Ott-Longoni et al. (1980), para isolar alcaloides piperidínicos. Parte do EE (200 g) foi solubilizado em solução aquosa 1,6 M de ácido acético (AcOH, 200 mL), e a solução resultante foi

filtrada para se obter a solução aquosa ácida I (SAA-I). Esta solução foi extraída com CHCl_3 com uma dupla lavagem de 150 mL, obtendo-se a solução aquosa ácida II (SAA-II). A SAA-II foi alcalinizada com NaOH até o pH 9,0 passando a ser chamada de solução aquosa básica I (SAB I). A SAB I passou por tripla lavagem de 100 ml com CHCl_3 , tornando o extrato clorofórmico básico (ECB), depois, adicionou-se 5 g de Na_2SO_4 , homogeneizou-se e deixou em repouso por 2 horas; em seguida, filtrou-se e transferiu-se a solução para o balão e, no evaporador rotativo a 38°C , evaporou-se o clorofórmio, transferindo o extrato seco para um recipiente limpo e pesado; após a evaporação completa do clorofórmio, pesou-se novamente para obter o rendimento (0,04 g).

O ECB foi solubilizado com 50 mL de clorofórmio em um funil de decantação, que, em seguida, procedeu-se a dupla lavagem com 50 mL de HCl 10% e a fração aquosa ácida foi separada, constituindo-se o extrato alcaloídico aquoso ácido.

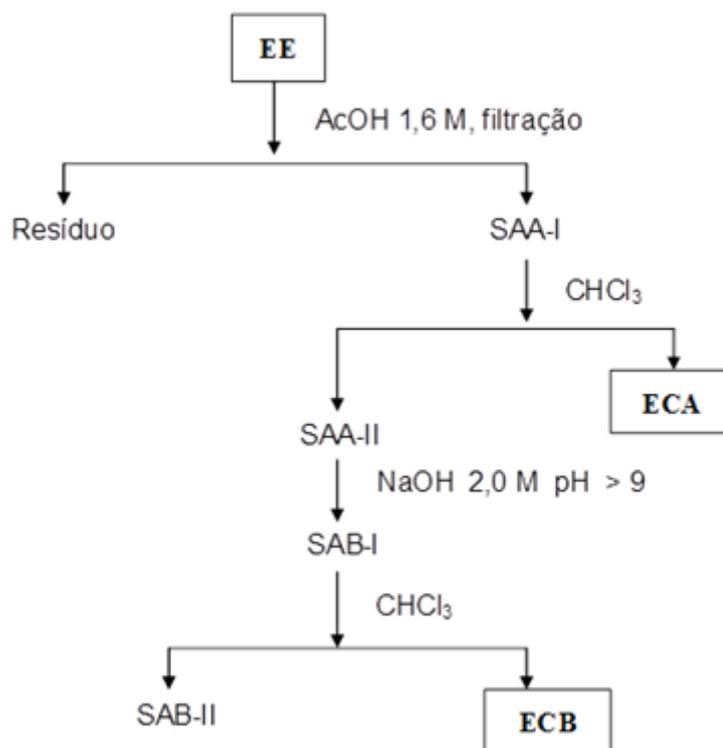


Figura 1. Fracionamento ácido-base do extrato etanólico para isolamento de alcaloides.



Figura 2. Placa de cromatografia com reagente de Dragendorff revelador de alcaloides.

Extrato alcaloídico II: 30 g de farelo de algaroba foi colocado em Erlenmeyer de rolha esmerilhada de 500 ml, em seguida, adicionou-se 150 ml de éter R e 7 ml de NH_4OH e procedeu-se agitação em uma mesa agitadora, durante 2 horas, de acordo com a metodologia de Simões et al. (1999). Após a sedimentação, o líquido foi filtrado com algodão em um Erlenmeyer de 250 ml, contendo 10 g de Na_2SO_4 , e a mistura, após agitação e repouso, foi filtrada. O líquido foi transferido para funil separador e adicionou-se duas vezes consecutivas 20 ml de HCl 20% e a camada aquosa foi recebida em um béquer. Uma alíquota de 1 ml da fração aquosa foi colocada em um tubo de ensaio e adicionou-se 1ml do reativo de Mayer para indicar a presença de alcaloides na solução por turvação (Figura 3).



Figura 3: Tubo com solução reagente de Mayer revelador de alcaloide.

2.3 Análises dos Extratos

As amostras de extrato alcaloídico I e II foram submetidas à derivatização por siliilação e analisadas em cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (CG-EM) para determinar picos de alcaloides.

2.4 Ensaio de incubação *in vitro*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz – UESC/Bahia, no período de junho a agosto de 2013. Os substratos, farelo de trigo e feno de Tifton 85 utilizados na incubação, foram moídos em moinho de faca tipo Willey, com peneira de malha a 1 mm e acondicionados individualmente em recipientes plásticos, para posteriores análises. As composições químico-bromatológicas dos farelos utilizados para a obtenção dos extratos etanólicos, bem como do farelo de trigo e feno de Tifton 85, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição químico-bromatológica (g/g matéria seca) dos farelos de vagem de *Prosopis juliflora*, farelo de trigo e do feno de Tifton 85.

Item	<i>Prosopis juliflora</i>	Tifton 85	Farelo de Trigo
Matéria Seca	92,2	90,7	89,8
Matéria Orgânica	96,2	92,2	92,9
Matéria Mineral	3,8	7,8	7,1
Proteína Bruta	7,2	6,8	17,4
Extrato Etéreo	1,6	1,1	2,4
Fibra Detergente Neutro	26,7	81,1	51,1
Fibra Detergente Ácido	23,5	46,6	7,1
NIDN ¹	0,2	0,4	4,1
NIDA ²	0,1	1,3	2,4
Carboidratos Totais	87,4	87,3	73,1
Carboidratos Não Fibrosos	60,5	2,8	17,9
Hemicelulose	3,2	34,5	44
Celulose	18,6	40,0	3,5
Lignina	4,9	5,7	3,6

¹nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN); ²nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA).

O delineamento experimental utilizado foi delineamento inteiramente casualizado (DIC), cujos tratamentos consistiram de dois aditivos naturais de vagem de algaroba (extrato alcaloídico I e extrato alcaloídico II) com três níveis cada um, o

controle positivo monensina sódica e o controle negativo sem aditivo, com três repetições para produção de gases e duas repetições para avaliação dos parâmetros da fermentação *in vitro* do farelo de trigo e do feno de Tifton 85.

Tabela 2 – Tratamentos agrupados de acordo com o substrato

Farelo de trigo	Feno de Tifton 85
Sem aditivo	Sem aditivo
Monensina sódica 5 µM	Monensina sódica 5 µM
3,9 µg de Extrato 1	3,9 µg de Extrato 1
7,9 µg de Extrato 1	7,9 µg de Extrato 1
12,0 µg de Extrato 1	12,0 µg de Extrato 1
3,9 µg de Extrato 2	3,9 µg de Extrato 2
7,9 µg de Extrato 2	7,9 µg de Extrato 2
12,0 µg de Extrato 2	12,0 µg de Extrato 2

A determinação da composição químico-bromatológica dos substratos e do farelo de vagem de algaroba, quais sejam: MS, proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), foi feita segundo métodos AOAC (1990), descritos por Silva & Queiroz (2002).

As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram feitas em autoclave, conforme Pell e Schofield (1993); em seguida, determinou-se o teor de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e em detergente ácido (NIDA), conforme Licitra et al. (1996); e lignina, conforme Van Soest et al. (1991). Os carboidratos não estruturais (CNE) foram estimados pela fórmula descrita por Sniffen et al. (1992).

A digestibilidade aparente *in vitro* (DA) da MS foi determinada segundo o método de Baumgardt et al. (1962), descrito por Silva & Queiroz (2002).

Amostras do fluido ruminal dos frascos de incubação foram coletadas nos tempos 12 e 24 horas de incubação para mensuração do pH, determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Para estimar o efeito dos extratos sobre o pH do meio ruminal, foi utilizado um potenciômetro digital imerso no conteúdo dos frascos, a cada tempo de incubação, antes da filtração das amostras. Este procedimento objetivou acompanhar a evolução deste

parâmetro ao longo do processo de fermentação, a fim de garantir que este se mantivesse dentro da faixa biológica *in vivo*.

Para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃), foi retirado do fluido ruminal dos frascos de incubação uma alíquota de 10 mL, que foi acidificada com 0,5 mL de ácido sulfúrico 20% e, para ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), retirou-se 2 mL de amostra, que foi acidificada com 0,5 mL de ácido metafosfórico 25% e, em seguida, armazenadas a -20°.

Ao final do experimento, as amostras foram descongeladas e, para sedimentação de partículas dos alimentos e protozoários, o sobrenadante foi utilizado nas incubações, centrifugadas a 5000 rpm (rotação por minuto), durante 10 minutos para sedimentação de partículas dos alimentos e protozoários e 2 mL do sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de N-NH₃, obtida após destilação com 5 mL de KOH 2N, conforme técnica modificada por Vieira (1980). No Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* Itapetinga, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 800 x g, por 15 minutos.

A identificação e a quantificação de ácidos graxos de cadeia curta foram realizadas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), segundo método preconizado por Erwin et al. (1961). A análise foi utilizada em um Cromatógrafo Líquido de Alto Desempenho, marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP, acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV), utilizando um comprimento de ondas: 210 nm. Foi preparada soluções-estoque na concentração de 20 mM dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, de forma a produzir uma soluções-padrão de AGCC de concentração conhecida. Para cada determinação, foram injetados 10 µL de amostra, sendo o resultado obtido através de um integrador que utilizou a solução padrão como base para o cálculo das concentrações de AGCC da amostra. Coluna: C18 (Fase Reversa), marca: Supelco, medida: 30 cm x 7.9 mm de diâmetro, fluxo na coluna de 1,0 ml/minuto. Pressão na coluna: 87 Kgf, fase móvel: Água em 1% de ácido ortofosfórico, volume injetado: 10 µL.

2.5 Ensaio de Produção de gases *in vitro*

O ensaio de produção de gases *in vitro* foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia-Brasil, conforme o protocolo de análise descrita por Maurício et al. (1999), considerando o

volume de gases produzidos a partir da medição da pressão gerada pelo acúmulo de gases, durante o processo fermentativo das amostras incubadas.

Uma solução tampão (943,9 mL) contendo NH_4HCO_3 (4,0 g / L) e NaHCO_3 (35,0 g / L) foi misturado com água destilada (500 ml); solução de microminerais (50 mL) foi adicionado $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6,6 g / L), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (5,0 g/L), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4,0 g/L); solução de macrominerais, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (8,9 mL), KH_2PO_4 (5,9 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,6 g/L), solução redutora (60 mL) cisteína -HCl (1,9 g/L), $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (1,9 g/L), NaOH (11,9 g/mL) e uma solução de resazurina (0,01 g/L) para preparar a solução de pré-digestão foi misturadas na ordem 500 mL de água destilada, solução tampão, solução macromineral, solução micromineral e solução indicadora. Essa mistura foi levemente agitada e saturada com CO_2 gasoso para atingir pH entre 6,8 – 6,9 e obter coloração rósea (THEODOROU et al., 1994).

Então, em cada frasco de 50 mL, foi adicionado 28 mL de meio tamponante, contendo micro e macrominerais e tamponantes, 3,9; 7,9 e 12 μg de solução de extrato alcaloídico e 0,3 g do substrato (farelo de trigo e feno de Tifton 85), em triplicata para cada extrato e para cada nível de extrato, além destes, foram incluídos 3 frascos contendo fluido ruminal e meio nutriente, que serviu como o branco. No tratamento controle positivo, foi adicionado o aditivo monensina sódica para atingir 5 μM .

O fluido ruminal utilizado nas inoculações foram de dois bovinos machos e adultos fistulados cirurgicamente no rúmen, mestiços, mantidos em semiconfinamento, cuja dieta era volumoso (*Brachiaria spp.*) e concentrado com 12% de proteína bruta à base de farelo de soja e milho.

Os bovinos foram mantidos em jejum hídrico e alimentar nas 12 horas que antecederam a coleta do fluido ruminal. Após a coleta e filtragem em tecido de nylon, com porosidade de 100 micras, o fluido ruminal de cada animal foi armazenado em garrafas térmicas pré-aquecidas, à temperatura de 39°C, para o transporte até o laboratório, saturados com CO_2 , e mantidos em banho-maria a 39°C.

O fluido ruminal (3 mL) foi inoculado nos frascos aspergidos com CO_2 , os substratos e meio de cultura, vedados com tampa de borracha expansiva e mantidos em estufa a 39°C, até o momento das leituras. Os frascos de vidro atingiram um volume final de 31,3 mL.

As leituras de pressão dos gases produzidos durante as fermentações foram realizadas às 01; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 12; 18; 24; 36; 48; 54; 60; 72 e 96 horas, após o início

das incubações. As leituras de pressão dos gases (psi – pressão por polegada quadrada) foram realizadas por intermédio de um transdutor de pressão, modelo PressData 800, acoplada a uma agulha 0,80 x 30 mm. A equação de regressão utilizada para a conversão de pressão (P) para volume [V (mL) = 0,04755 + 1,9754P + 0,01407P², (R² = 0,99) foi padronizada de acordo com a equação proposta por Santos et al. (2010), para a altitude local:

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

Os volumes obtidos nos intervalos de leitura supramencionados foram quantificados sequencialmente, de forma a se obter em determinados tempos a produção acumulada de gases. As curvas obtidas foram submetidas à interpretação por meio do procedimento iterativo de Gauss-Newton, o ajuste do modelo logístico bicompartimental, descrito por Schofield et al. (1994).

$$V_t = V_{f_1} \left\{ 1 + \exp\left[2 + \frac{4\mu m_1}{V_{f_1}} (L - t)\right]\right\}^{-1} + V_{f_2} \left\{ 1 + \exp\left[2 + \frac{4\mu m_2}{V_{f_2}} (L - t)\right]\right\}^{-1},$$

Em que:

V_t – volume acumulado de gases no tempo "t" (mL);

V_{f_1} – (mL/100 mg MS) equivale ao volume máximo de produção de gases produzido pelos carboidratos não fibrosos (CNF);

V_{f_2} – (mL/100 mg MS) equivale ao volume máximo de produção de gases produzido pelos carboidratos fibrosos (CF);

μm – taxa máxima de produção de gases (mL/h);

L – latência (h);

t – tempo de incubação (h);

"1" e "2" (subscritos) – referentes à cinética de produção de gases a partir de CF e CNF, respectivamente.

A razão $\mu m/V_f$ (unidade h⁻¹) representa a taxa específica de digestão/degradação da fração potencialmente degradável dos carboidratos contidos na matéria seca ou na parede celular insolúvel em solução detergente neutra (kd/h) do substrato (SCHOFIELD et al., 1994), que corresponde à taxa específica de crescimento microbiano sob a hipótese de uma relação diretamente proporcional entre o volume dos gases produzidos, a massa microbiana e o substrato degradado.

Este modelo permite decompor a produção acumulada de gases oriunda da fermentação do substrato em duas fases distintas, uma de degradação rápida e outra de degradação com fluido ruminal *in vitro*.

2.7 Quantificação de Metano

Ao final das incubações, nos tempos 12 e 24 horas, coletou-se os gases com seringas graduadas de 20 mL, com auxílio de agulha (25 x 7 mm) acoplada à uma válvula, a qual foi introduzida aos frascos de incubação para a coleta dos gases. Logo após, a válvula foi fechada e a extremidade foi hermeticamente fechada com silicone para evitar escape dos gases e, por fim, procedeu-se a injeção de 200µL de gases no cromatógrafo. A determinação do gás CH₄ foi realizada em cromatógrafo de fase gasosa Varian CP-3800, equipado com as colunas Porapak Q e Peneira Molecular e detector de condutividade térmica, usando como padrões o gás metano 3,025; 10,080; 17,020 e 24,080%, com detector a 250°C, fluxo de coluna 1,5 mL/min e temperatura forno da coluna a 90°C. A produção de CH₄ foi expressa com base na matéria seca incubada.

2.8 Análise estatística

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), sendo cada substrato testado isoladamente. Os dados foram analisados pelos procedimentos da análise de variância e de regressão.

Foram empregados como ferramenta de auxílio os procedimentos PROC GLM e PROC REG, do programa SAS (Statistical Analysis System, 2008, versão 9.2), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade em todos os procedimentos estatísticos realizados.

$$Y_{ij} = \mu + Tr_i + \epsilon_{ij};$$

Em que: Tr = extrato alcaloídico (0; 3,9; 7,9 e 12 µg).

Para a comparação dos níveis de extrato alcaloídico com monensina, Tr = extrato alcaloídico (0; 3,9; 7,9 e 12 µg) e monensina (5 µM), aplicou-se o teste de Dunnett (P < 0,05) e comparou-se o efeito dos níveis dos extratos alcaloídicos e monensina para produção total de gases e de metano, pH, produção de N-amoniaco e de ácidos graxos de cadeia curta:

$$Y_{ij} = \beta_0 + \beta_1 Tr_i + \beta_2 Tr_i^2 + \beta_3 Tr_i^3 + \epsilon_{ij};$$

Em que: Y = variável dependente do tratamento; β_0 = intercepto; β_1 , β_2 e β_3 , que define a variação de Y como uma função do tratamento, Tr = tratamento.

Quanto aos fatores quantitativos (níveis de substituição dos extratos pelo aditivo padrão), procedeu-se a análise de regressão polinomial. Testou-se o modelo de regressão linear simples ($\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x$) e, em seguida, o modelo de segundo grau ($\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 x^2$), em que se considerou “ \hat{Y} ” como variável dependente e “x” como variável independente, além de “ β_0 , β_1 e β_2 ”, como coeficientes médio, de efeito linear e de efeito quadrático, respectivamente.

Diante da semelhança estatística de dois modelos, optou-se pelo de menor ordem e àqueles cuja significância das variáveis que compunham o modelo foi significativa. Como medida de precisão do modelo, utilizou-se o coeficiente de determinação (R^2/r^2).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na identificação de substâncias alcaloides, observou-se que o extrato alcaloídico I apresentou constituído pelos cromatogramas HPLC-MS, obtidos dos dois extratos. O extrato I apresentou-se constituído por uma concentração relativa de 7.000 ppm em alcaloide piperidínico com uma similaridade de 81% (Figura 4). Por outro lado, não se detectou alcaloide piperidínico no extrato II pelo HPLC-MS (Figura 5). A fração alcaloídica, obtida a partir da vagem de *Prosopis juliflora*, foi avaliada quanto à sua propriedade antibacteriana, atuando principalmente sobre as estirpes bactérias Gram-positivas do rúmen, durante a digestão, como as *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*, que produz ácido láctico e reduz drasticamente o pH e compromete o hospedeiro e celulolíticas como *Ruminococcus flavefaciens*, que, normalmente, produz ácido acético como um dos principais produtos de fermentação da fibra, juntamente com o ácido fórmico, H₂ e CO₂, quando as bactérias celulolíticas liberam H₂ e CO₂, essas moléculas são substratos para a metanogênese pelas Archaea e considera a energia perdida pelos ruminantes.

Santos et al. (2013) relataram que o espectro de ressonância magnética nuclear constatou a presença de *prosoflorina*, *juliprosina* e *juliprosopina* no extrato clorofórmico básico (ECB). Os extratos são obtidos de forma concentrada, a partir de parte de vegetais (caule, raiz, sementes e outros), e caracterizados de acordo com a sua variedade de substâncias e natureza química e solubilidade, neste caso, o extrato pode ter outros compostos além dos alcaloides. A fim de se obter um extrato solúvel em água, para evitar a utilização de solventes orgânicos, no presente trabalho, fez-se necessário realizar a purificação, acidificando com ácido clorídrico a 20%. Na solução ácida os alcaloides podem ser mais solúveis, podendo atuar mais livremente sobre os microrganismos ruminais no meio incubado *in vitro* e também eliminar outras substâncias contaminantes, que tenham polaridades semelhantes aos alcaloides. O extrato, após a purificação ácida, revelou um pico de alcaloides dentre outros compostos orgânicos encontrados no extrato alcaloídico I (Figura 4) e, no extrato alcaloídico II (Figura 5), foi detectado maior quantidade de substâncias orgânicas consideradas como interferentes e não demonstrou elevação de pico de alcaloides.

Ainda que o método de extração II não extraiu os alcaloides piperídínicos de vagens de algaroba, optou-se por utilizá-lo nos ensaios como contra-prova para extração de alcaloides em vagens de algaroba.

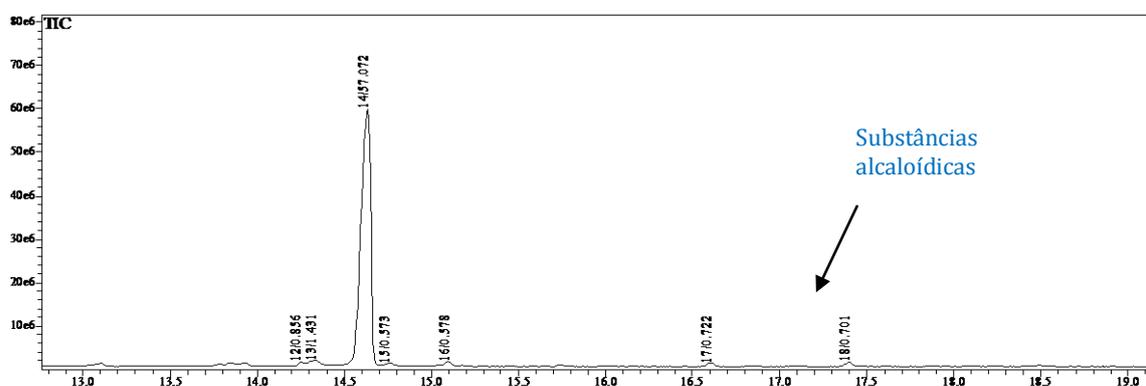


Figura 4. HPLC-MS do extrato alcaloídico I de vagem de *Prosopis juliflora*.

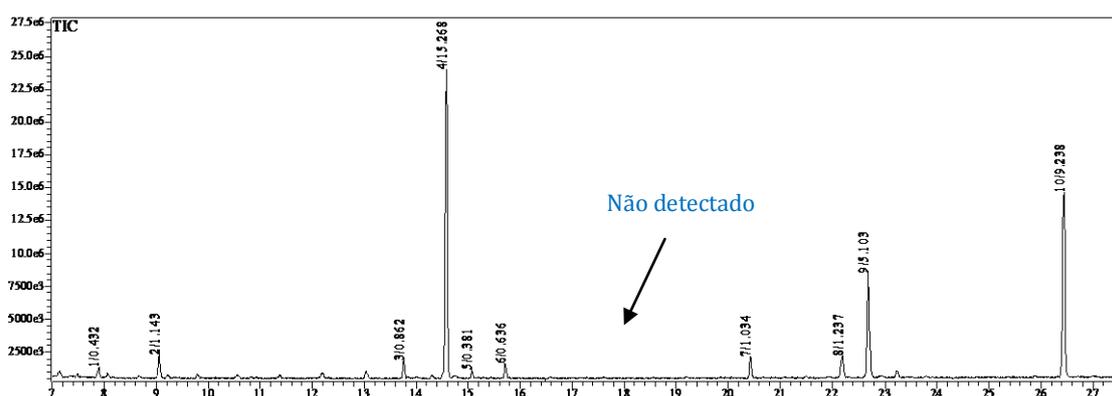


Figura 5. HPLC-MS do extrato alcaloídico II de vagem de *Prosopis juliflora*.

Os parâmetros das equações de regressão são o volume final de gases produzidos dos carboidratos totais (VFT), não-fibrosos (VFCNF) e fibrosos (VFCF), as taxas de digestão específicas e *lag time* para as amostras (Tabela 3).

O extrato alcaloídico I apresentou melhor atividade entre os dois extratos utilizados sobre os parâmetros cinéticos de produção de gases, por ter proporcionado menor volume final de gases produzidos pela fração fibrosa, quando houve adição de 7,9 μg e 12 μg ao meio de incubação com o substrato farelo de trigo e, para o nível de 7,9 μg , com feno de Tifton 85.

Ao utilizar o farelo de trigo como substrato, observou-se que não existiu diferenças ($P > 0,05$) para o VFCNF, KdCNF e Lag, entre a monensina e cada um dos níveis do extrato e, também, dentro dos níveis de extrato estudados.

Tabela 3. Estimativa dos parâmetros da cinética de fermentação ruminal *in vitro* em função do nível de extrato alcaloídico de algaroba em substrato farelo de trigo e feno de Tifton 85.

Parâmetro	Monensina 5 µM	Extrato	Nível de extrato alcaloídico de algaroba				CV (%)	Valor P R ¹
			0 µg	3,9 µg	7,9 µg	12 µg		
Farelo de trigo								
VfCNF (mL/g MS)	113,87	I	114,21	123,92	123,32	137,22	10,57	
	113,87	II	114,21	130,61	114,44	127,84	13,31	
KdCNF (%/h)	0,082	I	0,081	0,087	0,083	0,076	10,89	
	0,082	II	0,081	0,089	0,076	0,088	9,00	
Lag (h)	2,81	I	2,96	3,49	2,38	2,53	16,52	
	2,81	II	2,96	2,97	1,79	2,69	22,82	
VfCF (mL/g MS)	66,42*	I	90,51*	96,71*	80,72	68,45	8,29	0,0094 ²
	66,42	II	90,51	86,18	68,72	77,52	15,76	
KdCF (%/h)	0,018*	I	0,015	0,015	0,015	0,012*	6,06	0,0001 ³
	0,018	II	0,015	0,015	0,012	0,013	15,25	
VFT (mL/g MS)	180,29*	I	204,72	220,63*	204,04	205,66	5,76	
	180,29	II	204,72	216,78	183,16	205,36	11,56	
Feno de Tifton 85								
VfCNF (mL/g MS)	153,32	I	150,17	134,80	112,99	91,23	23,36	
	153,32*	II	150,17	135,49	144,66	133,63*	5,40	
KdCNF	0,018	I	0,021	0,022	0,024	0,034	25,02	
	0,018	II	0,021	0,023	0,023	0,021	6,33	
Lag (h)	9,73*	I	11,29	10,43	4,46*	7,58*	28,45	
	9,73	II	11,29	9,03	12,00	7,21	27,49	
VfCF (mL/g MS)	49,22*	I	68,74	67,91	86,02*	114,97*	17,86	0,0010 ⁴
	49,22	II	68,74	77,29	118,30	95,77	34,38	
KdCF (%/h)	0,004	I	0,006	0,008	0,010	0,011	55,35	
	0,004	II	0,006	0,007	0,004	0,005	40,36	
VFT (mL/g MS)	202,54	I	218,92	202,71	199,01	206,20	14,27	
	202,54	II	218,92	212,78	262,96	229,40	12,28	

*Médias seguidas pelo asterisco diferem pelo teste Dunnett (P<0,05) do tratamento Monensina. ¹Análise de regressão considerando as médias dos tratamentos Monensina e extratos alcaloídico (3,9; 7,9 e 12,0). Volume final de gases produzidos de CNF (VfCNF); taxas de digestão específicas CNF (KdCNF); latência (Lag); volume final de gases produzidos de carboidratos fibrosos (VfCF); taxas de digestão específicas CF (KdCF); de gases produzidos dos carboidratos totais (VFT). $Y^2 = -0,6583X^2 + 7,6393X + 69,0999$ ($R^2=0,77$); $Y^3 = -0,000473X + 0,0179$ ($r^2=0,86$); $Y^4 = 5,3895X + 47,4634$ ($r^2=0,99$)

Por conseguinte, verifica-se que o volume de gases produzidos pela degradação da fração fibrosa (VfCF) teve interferência da concentração do extrato I, adicionado ao meio, sendo que as quantidades de 7,9 µg e 12 µg se assemelharam à monensina com menor valor. A taxa de degradação dos carboidratos fibrosos com o aditivo extrato I a

12 µg foi menor em relação à monensina, provavelmente, indicando seletividade do extrato sobre a microbiota, porém, com eficiência em degradar a fibra do farelo de trigo.

Ao utilizar o feno de Tifton 85, o extrato alcaloídico I proporcionou menor tempo de colonização relativo à monensina, a partir das quantidades de 7,9 µg e 12 µg adicionadas, e com maior produção de gases da fração fibrosa, mas sem interferir no volume total dos gases produzidos durante a fermentação dos carboidratos. Consistente com o resultado observado com o farelo de trigo, também com o feno de Tifton 85, a seletividade sobre os microrganismos fibrolíticos não prejudicou a degradação da fibra, mesmo que ambos os substratos apresentem fibra de qualidades distintas.

O *lag time* (L), ou seja, o tempo de colonização é um parâmetro pertinente e está intimamente relacionado à degradação da fração fibrosa (RUSSELL & WALLACE, 1997). O período de colonização efetiva pelas bactérias na fermentação *in vitro* tem a contribuição do tipo de inóculo, ambiente ruminal, fluido ruminal, de acordo com a dieta, e pela eficiência da manipulação do líquido. Os tempos para os 2 extratos alcaloídicos foram semelhantes, só diferindo no tempo para o feno de Tifton 85, no qual obteve maior tempo para colonização da fração fibrosa. Moreira et al. (2010), trabalhando com associações compostas por Capim-Elefante com milho duro ou dentado, resultaram em tempos numericamente maiores de *lag time*, provavelmente, devido à proteção da matriz proteica, bem como ao tipo do amido presente, o que não favoreceu a rápida colonização dos carboidratos pelos microrganismos.

O volume final de gases da fração de carboidratos fibrosos (VfCF) e a taxa específica de degradação dos carboidratos fibrosos (KdCF) variaram de forma quadrática ($P < 0,05$) para o farelo de trigo submetido ao extrato alcaloídico I (Tabela 3), estimando-se mínima produção de gases com adição de 2,044 µg. E embora tenha havido diferenças numéricas entre os parâmetros cinéticos: volume final de gases da fração de carboidratos não-fibrosos (VfCNF) e a taxa específica de digestão dos carboidratos não-fibrosos (KdCNF), observados pela técnica de produção de gases, a análise estatística não detectou efeito, e uma possível explicação seria o elevado coeficiente de variação que, conseqüentemente, resulta em médias estimadas semelhantes. O VFT de gases produzidos, embora não significativo ($P > 0,05$), apresentou-se diferenças na quantidade adicionada de extrato I. Magalhães (2005), em silagens de sorgo em 48 horas de incubação, obteve uma variação nos valores de produção acumulada de gases de 224 e 231 mL/g MS, resultados semelhantes aos

observados neste experimento, principalmente nos tratamentos contendo extrato II, que não apresentaram eficiência em mitigar metano.

Segundo Russel & Strobel (1989), a produção de CH₄ pode representar uma perda excessiva de 12% da energia do alimento. No entanto, os ionóforos podem diminuir essas perdas por metano em 30% (SCHELLING, 1984). A ação da monensina ocorre principalmente pela alteração no metabolismo, com consequências em reduzir o crescimento dos microrganismos gram positivo do rúmen. Santos et al. (2013) constataram que tanto a monensina como o extrato clorofórmico básico (ECB) de algaroba diminuíram a produção de gases ao longo de 36 h de incubação *in vitro*, quando em comparação com o controle, inferindo que os alcaloides extraídos de vagens de *P. juliflora* poderiam ter mitigado a produção de CH₄, por desestabilizar seletivamente as relações entre comunidade microbiana, metanogênica e bactérias fibrolíticas.

Tal observação leva a ponderar que a produção total de gases está diretamente relacionada com o conteúdo de carboidratos do alimento, aliado à acessibilidade que este oferece à degradação microbiana. Santos et al. (2013) observaram que a monensina não provocou os efeitos esperados sobre a diminuição do volume de gases provenientes da degradação da fração lenta, a partir de 36 horas de incubação. Neste estudo, a cinética de gases foi quantificada a partir do volume de gases produzidos pelos CNF e CF e o feno de Tifton 85, que teve maior fração de carboidratos de degradabilidade lenta, apresentou menor volume final de gases originados da fermentação dos carboidratos fibrosos (VfCF), utilizando a monensina no período estimado de 48 horas, evidenciando que houve inibição de cepas de bactérias que atuam nos substratos específicos.

Foi observada uma relação entre os substratos utilizados (farelo de trigo e feno de Tifton 85) e os valores de volume de gases produzidos dos carboidratos totais (Tabela 3), nos quais o farelo de trigo, que apresenta maior teor de carboidratos mais rapidamente fermentáveis (22,0%) e feno de tifton 85 (6,3 %), aliados a um baixo teor de lignina 3,6 e 5,7% (farelo de trigo e feno de Tifton 85), respectivamente, apresentaram, na maioria, médias de volume de gases produzidos dos carboidratos totais, durante a incubação, menor do que o feno de Tifton 85, substrato rico em fibra insolúvel. As diferenças observadas entre o farelo de trigo e feno de Tifton 85, quanto à produção de gases, também podem ser atribuídas às diferenças populacionais

microbianas do rúmen, uma vez que o pool de microrganismos fibrolíticos pode diferir entre os substratos utilizados, assim como no animal difere de acordo com o tipo de dieta.

Segundo Gastaldi (2003), tanto o padrão da fermentação ruminal quanto a produção de gases se alteram na dependência da qualidade do volumoso da ração e das interrelações fisiológicas, podendo não haver modificações quantificáveis na degradação do alimento, sendo este efeito observado no desempenho do animal.

Os valores médios de pH (Tabelas 4 e 5), meio de incubação *in vitro*, variaram entre 6,50 a 6,66 para farelo de trigo (fibra em detergente neutro 51,1 %) e 6,64 a 7,05 para feno de Tifton 85, valores considerados ideais para melhor fermentação com substratos ricos em fibra em detergente neutro (81,1%). No período de 12 h de incubação, utilizando farelo de trigo, houve efeito ($P < 0,05$) de extrato sobre o pH no nível de inclusão 7,9 μg , com menores médias (6,52 e 6,60) de extrato alcaloídico I ou extrato alcaloídico II, respectivamente, em relação à monensina, sendo que os valores dos extratos foram inferiores ($P < 0,05$) aos observados pela incubação com monensina (Tabela 4). Já nas incubações *in vitro* com substrato feno de Tifton 85, no período de até 12h de incubação, houve diferença ($P < 0,05$) de pH para os níveis 7,9 e 12 μg , com valores médios de 6,96 e 6,93, respectivamente, comparando-se com a monensina, que apresentou valor de 7,05. O pH do meio, quando se utilizou esse mesmo substrato incubado com o extrato alcaloídico II, foram menores ($P < 0,05$) nos níveis de adição 3,9 e 12 μg , com valores médios de 6,96 e 6,97, respectivamente, em relação à monensina.

Na Tabela 5, após período de 24 h de incubação *in vitro* utilizando extrato alcaloídico I, o pH não diferiu ($p > 0,05$) para o farelo de trigo e feno de Tifton 85. Com o extrato alcaloídico II, somente houve diferença para o farelo de trigo, provavelmente, apresentou significância devido ao baixo coeficiente de variação; já com o substrato feno de tifton 85, não diferiu ($p > 0,05$). É importante salientar que a técnica *in vitro* é mais eficiente na manutenção do pH ruminal do que observado *in vivo*, devido ao controle de nutriente disponível e de fatores externos.

O princípio das técnicas *in vitro* é manter amostras de alimento em contato com conteúdo ruminal, tamponado em um recipiente, no qual se tenta reproduzir as condições existentes no rúmen, tais como presença de microrganismos, anaerobiose, temperatura de 39°C e pH de 6,9 (MOULD et al., 2005). Neste trabalho, observou-se que o pH de incubação manteve-se no valor ideal para fermentação de carboidratos

fibrosos. Portanto, o pH é um dos fatores importante, quando se relaciona a produção de metano no metabolismo ruminal. Van Kessel et al. (1996) e Lana et al. (2001) relataram que animais ruminantes recebendo dietas exclusivas de forragens apresentam pH ruminal relativamente com pequena variação (6,6 a 6,9), mas, quando recebem concentrado na dieta, o pH diminui para valores abaixo de 5,4. Como o presente trabalho foi realizado *in vitro*, com apenas uma fonte de substrato no frasco, o tratamento com farelo de trigo não apresentou pH inferior a 6,5. As bactérias fermentadoras do rúmen em dietas exclusivas de forragens convertem CO₂ e H⁺ em metano, enquanto, com dietas à base de concentrados ou de forrageiras de muito boa qualidade, a produção de metano diminui drasticamente, quando o pH é menor que 6,0. Neste trabalho, a forragem utilizada foi de excelente qualidade, entretanto, o pH ruminal não apresentou valores abaixo de 6,74. Foi notado que a adição de extratos alcaloídico de *Prosopis juliflora* não modificou o pH ruminal.

Quando utilizou-se o farelo de trigo como substrato na incubação *in vitro*, os valores médios da concentração de N-amoniaco no fluido de incubação ruminal *in vitro* não diferiram ($P>0,05$) entre a monensina e os níveis dos extratos, para o farelo de trigo utilizando extrato alcaloídico I e II.

Para o feno de Tifton 85, usando o extrato alcaloídico II ao final do período de 12 h de incubação (Tabela 4), e o N-amoniaco, para farelo de trigo em 12 horas de incubação, não diferiram ($P>0,05$), porém, observou maior valor para o controle positivo (monensina), comparando com o controle negativo, as bactérias celulolíticas têm como principal fonte de nitrogênio a amônia, que resulta do processo fermentativo da proteína, o ionóforo monensina, provavelmente, diminuiu o crescimento de bactérias celulolíticas Gram positivas e proteolíticas, indicando que, pela seletividade microbiana, ocorreu menor degradação aparente da fibra e, conseqüentemente, teve um excedente de nitrogênio disponível. Com o substrato feno de Tifton em até 12 horas de incubação, não se observou este comportamento, em razão de ser um substrato de lenta degradação e a monensina apresentar uma ação de curto prazo.

Mesmo não sendo significativos ($P>0,05$), o N-amoniaco em 12 horas de incubação (Tabela 4), tratamento com 7,9 µg de extrato alcaloídico I, com farelo de trigo, proporcionou média superior aos demais tratamentos, resultado igual ao tratamento com monensina (10,385 mg/g); e observou-se que a DAMS, para este tratamento, foi maior que aos demais, levando a acreditar que ocorreu uma seletividade

nas espécies de microrganismos celulolíticos, permanecendo fermentadoras de carboidratos gram-negativa, e contribuindo para uma menor produção de CH₄ sem comprometer a degradabilidade da matéria seca do substrato, neste caso, também o pH pode ter colaborado com latência de colônias de bactérias que exige um pH abaixo de 6,9.

Com 24 horas de incubação, os dois aditivos naturais de algaroba proporcionaram o mesmo comportamento observado em 12 horas de incubação e o tratamento sem aditivo apresentou-se com uma concentração de N-NH₃ superior à monensina, sem que alterasse a DAMS, indicando que ocorreu desenvolvimento diversificado de microrganismos fermentadores, maior degradação de proteína e possivelmente contribuiu para maior concentração de N-amoniaco no meio incubado com farelo de trigo (Tabela 5). Segundo Satter & Slyter (1974), as concentrações de N-NH₃ ruminal, suficientes para suportar o crescimento bacteriano, deve ser, no mínimo, de 5 mg N-NH₃/100 mL. Os teores de N-NH₃ deste trabalho foi superior a 7,0 mg de N-NH₃ *in vitro*, que proporcionou uma disponibilidade ideal de nitrogênio para os microrganismos, em virtude disso, não comprometeu a degradabilidade aparente da MS.

Em até 12 horas de incubação (Tabela 4), o feno de Tifton 85 somente houve diferença (P<0,05) para N-NH₃, com a adição de monensina, além de contribuir com a redução de metano do sistema de incubação. Valores superiores de N-NH₃ foram observados, demonstrando que houve uma tendência de perda de N na forma de amônia, nos níveis 3,9 e 12,0 µg, para o extrato alcaloídico I, provavelmente houve maior desaminação de proteínas no meio incubado e utilizado pela microbiota, que pode ter elevado a produção de resíduo da fermentação, levando ao crescimento da população de *archaeas* metanogênicas.

Nos períodos de 12 e 24 horas de incubação (Tabelas 4 e 5), utilizando extrato alcaloídico I, os valores médios da produção de metano entérico, com farelo de trigo e feno de Tifton 85, diferiram da monensina (P<0,05), quando foram adicionados nas quantidades de 3,9 e 7,9 µg. Porém, 12 µg não diferiram no meio.

Tabela 4 - Produtos da fermentação ruminal *in vitro* com extratos alcaloídicos de *Prosopis juliflora* e monensina, no período de 12 horas de incubação.

Parâmetro	Monensina 5 µM	Extrato	Nível de extrato alcaloídico de algaroba				CV (%)	Valor P R ¹
			0 µg	3,9 µg	7,9 µg	12 µg		
Farelo de trigo								
pH	6,645*	I	6,620	6,570	6,520*	6,585	0,38	0,0181 ²
	6,645*	II	6,620	6,655	6,605*	6,640	0,15	
DAMS (%)	48,805	I	52,705	53,660	53,680	49,320	5,90	
	48,805	II	52,705	55,845	51,405	55,350	7,01	
N-NH ₃ (mg/g)	10,385	I	7,005	9,180	10,385	9,420	13,17	
	10,385	II	7,005	10,145	9,660	9,420	12,12	
CH ₄ (mL/g MS)	2,175*	I	4,620*	2,655	0,955*	1,630	23,94	
	2,175*	II	4,620*	5,185*	4,790*	5,955*	8,58	0,0085 ³
Feno de Tifton 85								
pH	7,050*	I	7,005	6,980	6,960*	6,930*	0,30	0,0023 ⁴
	7,050*	II	7,005	6,965*	7,000	6,975*	0,23	
DAMS (%)	15,060	I	19,980	18,695	16,525	16,550	7,74	
	15,060*	II	19,980*	15,190	16,780	12,005*	5,79	0,0645 ⁵
N-NH ₃ (mg/g)	8,455*	I	9,660	10,145*	7,490	10,145*	7,80	
	8,455	II	9,660	9,905	8,210	8,695	9,30	
CH ₄ (mL/g MS)	0,100*	I	0,520*	0,720*	0,560*	0,080	6,38	0,0004 ⁶
	0,100	II	0,520	1,945	0,605	1,410	5,12	

*Médias seguidas pelo asterisco diferem pelo teste Dunnett (P<0,05) do tratamento monensina. ¹Análise de regressão considerando as médias dos tratamentos monensina e extratos alcaloídicos (3,9; 7,9 e 12,0 µg).

²Y = 0,0022X² - 0,0323X + 6,6494 (R² = 0,99); ³Y = -0,0291X² + 0,6222X + 2,4363 (R² = 0,843); ⁴Y = -0,0094X + 7,0369 (r² = 0,92); ⁵Y = -0,0769X² + 0,7326X + 14,6688 (R² = 0,75); ⁶Y = -0,0171X² + 0,1995X + 0,126 (R² = 0,9602)

Os tratamentos com extrato II e o controle negativo (sem aditivos) com farelo de trigo, no período de 12 h de incubação, apresentaram duas vezes mais a média de produção de metano (P<0,05), comparado ao tratamento controle positivo (monensina sódica), esses resultados confirmam o baixo potencial bioativo desse extrato produzido pela metodologia utilizada para extração dos alcaloides, detectada através da análise de cromatografia líquida de alto desempenho-espectrometria de massa (HPLC-MS).

Para o extrato alcaloídico I, os tratamentos com 3,9; 7,9 e 12 µg apresentaram comportamento cúbico, no qual o 3,9 µg (2,655 mL/g MS) foi a quantidade adicionada que apresentou semelhança em inibir a produção de gás metano ao ionóforo monensina sódica (2,175 mL/g MS). A adição de 7,9 µg com o extrato alcaloídico I e farelo de

trigo, em até 12 horas, resultou em menor ($P < 0,05$) produção de CH_4 (0,955 mL/g MS) e, ao extrapolar este valor para 24 horas de produção, teria um total de 22,92 mL/g MS/dia, seguido do tratamento com 12 μg com média de produção também inferior ao controle positivo; esses valores indicam o potencial do extrato I, como um produto natural de algaroba para reduzir a emissão de metano entérico. Janssen & Kirs (2008) afirmaram que limitar a atividade de metanogênicas ruminais pode resultar em ganhos de produtividade animal, se as taxas e padrões de fermentação da dieta não forem prejudicados. A partir desse pressuposto, pode-se considerar que o extrato alcaloídico I de vagens de algaroba seja uma opção de aditivo, por não afetar a degradabilidade dos alimentos e de outros parâmetros fermentativos.

No período de 12 h incubação, o feno de Tifton 85 apresentou, de forma geral, menor produção de CH_4 , comparado ao substrato farelo de trigo, no mesmo período de incubação, provavelmente, devido ao menor tempo de colonização associado à baixa taxa de degradação. O extrato alcaloídico I diferiu da monensina para o feno de Tifton 85 ($P < 0,05$) nos níveis de inclusão 3,9 μg (0,720 mL/g MS) e 7,9 μg (0,560 mL/g MS), semelhantes ao tratamento controle negativo (0,520 mL/g MS), indicando que estes níveis não apresentaram potencial suficiente para atuar na redução do gás metano, proveniente da fermentação do feno, durante as primeiras 12 horas de fermentação.

Crompton et al. (2009) quantificaram emissões diárias de metano de 524 a 632 litros/dia em vacas em lactação com dieta na proporção de 50:50 silagem de capim e concentrado com quatro fornecimentos diário iguais. Se extrapolar o valor de 0,520 mL/g MS do tratamento sem aditivos para l/kg, resulta em 520 litros/kg MS, isso é um valor de metano indesejado, que provavelmente ocorre alta perda de energia e baixa eficiência de produção.

Em contrapartida, no tratamento com 12 μg (0,080 mL/g MS), verificou-se menor produção, comparado ao tratamento controle positivo (monensina) e aos demais, e mantendo o pH (6,9) estável e semelhante ao ideal do rúmen, apontando eficiência deste nível de inclusão do extrato I na redução do gás CH_4 .

Rivera et al. (2010), trabalhando com feno de capim-Tifton 85 e complexo de leveduras e monensina como aditivos, encontraram valor médio do volume de metano de 21,04 e 22,29 mL/g MS para os dois aditivos e concluíram que a concentração de metano não foi alterada pelo uso dos aditivos testados no meio de fermentação *in vitro*, por 24 horas. Neste estudo, os valores observados foram menores e diferiram entre os

aditivos utilizados na incubação. Tendo em vista que a fonte de substrato foi semelhante, pode-se inferir que os alcaloides do extrato I podem atuar inibindo bactérias celulolíticas gram-positivas e/ou metanogênicas, já que a monensina sódica é caracterizada como um aditivo que promove indiretamente a redução de metano, inibindo o crescimento de bactérias celulolíticas gram-positivas que liberam íons de H^+ como produto intermediário, originado da fermentação dos carboidratos fibrosos. A produção de metano está diretamente proporcional à concentração de H_2 dissolvida no rúmen, geralmente a digestão de alimento fibroso libera mais prótons.

Estudos em ovinos utilizando extratos de leguminosas com fontes de saponinas relataram reduções de 10 a 15% na produção de metano (PEN et al., 2007; WANG et al., 2009). Resultados semelhantes foram relatados com extrato de saponinas de *Sapindus* por Mao et al. (2010), que observaram uma diminuição na produção de metano de 27%, durante o crescimento de cordeiros. Trabalhos utilizando variedades de azevém, que contenham teores de açúcares solúveis elevados (ou seja, 20,5 g/kg MS), mostraram reduzir a produção de metano por kg de ganho de peso vivo por até 25% em cordeiros em crescimento (KIM et al., 2011). Assim, como a vagem de *Prosopis juliflora* é rica em açúcares, na forma de extrato ou *in natura*, pode contribuir com a mitigação.

Tem-se referido que algumas plantas que contêm inibidores de metano podem apresentar efeitos adversos sobre o metabolismo ruminal ou na fisiologia animal, como redução na digestibilidade (BEAUCHEMIN & MCGINN, 2006). Com o substrato feno de Tifton 85 em 12 horas de inoculação (Tabela 4), os tratamentos com 3,9 e 12 μg foram os que obtiveram pH menor, portanto, 12 μg apresentou menor produção de CH_4 , comparado ao controle positivo (monensina) e, mesmo com a DAMS não apresentando diferença significativa, pode estimar que os microrganismos fermentadores cooperaram com a mitigação de metano *in vitro*.

O extrato alcaloídico I, adicionado ao meio contendo o farelo de trigo e feno de Tifton 85, após 12 h de inoculação, demonstrou eficiente em mitigar metano entérico (Figura 5). A intensidade da ação seletiva bacteriana deste extrato sobre a fermentação ruminal parece ser imediata, quando o inóculo é proveniente de animais não adaptados, que se assemelhou ao comportamento do efeito da monensina, considerando as primeiras 12 horas, que foi o período ativo de ação da monensina. O nível de 3,9 μg de extrato alcaloídico I não apresentou efeito de mitigação, concluindo-se que esta

quantidade de extrato alcaloídico I foi ineficaz em modificar a fermentação dos substratos no meio ruminal, visto que não diferenciou da média do controle sem aditivos.

Tabela 5 - Produtos da fermentação ruminal *in vitro* com extratos alcaloídicos de *Prosopis juliflora* e monensina no período de 24 horas de incubação.

Parâmetro	Monensina 5 µM	Extrato	Nível extrato alcaloídico de algaroba				CV (%)	Regressão ¹
			0 µg	3,9 µg	7,9 µg	12 µg		
Farelo de trigo								
pH	6,580	I	6,575	6,590	6,530	6,500	0,53	
	6,580*	II	6,575	6,605	6,550*	6,575	0,12	0,0192 ²
DAMS (%)	61,425	I	67,135	66,725	68,850	66,770	3,18	
	61,425	II	67,135	68,475	64,785	65,520	5,63	
N-NH ₃ (mg/g MS)	9,420	I	14,735	11,110	11,350	10,145	13,36	
	9,420*	II	14,735*	11,355	11,355	11,350	8,79	0,0696 ³
CH ₄ (mL/g MS)	2,540	I	7,190	4,120	3,540	1,195	58,39	
	2,540*	II	7,190*	9,440*	7,840*	9,365*	7,94	0,0261 ⁴
Feno de Tifton 85								
pH	6,850	I	6,745	6,755	6,720	6,640	1,16	
	6,850	II	6,745	6,790	6,740	6,865	1,69	
DAMS (%)	39,655	I	37,065	36,085	37,655	42,790	14,63	
	39,655	II	37,065	39,635	31,955	34,015	12,55	
N-NH ₃ (mg/g MS)	10,140	I	9,175	8,215	7,005	9,905	10,59	
	10,140	II	9,175	9,900	9,660	10,385	10,02	
CH ₄ (mL/g MS)	5,405*	I	5,325	6,930	1,730*	2,850	28,94	0,0132 ⁵
	5,405	II	5,325	6,820	6,140	6,485	21,59	

*Médias seguidas pelo asterisco diferem pelo teste Dunnett ($P < 0,05$) do tratamento Monensina. ¹Análise de regressão considerando as médias dos tratamentos Monensina e extratos alcaloídicos (3,9; 7,9 e 12,0 µg).

² $Y = 0,000041X^3 - 0,00747X^2 + 0,2920X + 6,580$ ($R^2 = 0,99$); ³ $Y = -0,0840X^2 + 1,4792X + 3,1538$ ($R^2 = 0,78$); ⁴ $Y = -0,0034X^3 - 0,0615X^2 + 0,2274X + 5,4050$ ($R^2 = 0,99$)

Os níveis de 7,9 e 12 µg de extrato alcaloídico I foram mais eficientes na mitigação de metano, tanto no período de 12 h quanto no de 24 h de incubação em relação à monensina. Pode-se observar que o extrato alcaloídico I é capaz de modificar a fermentação por maior prazo de tempo em relação à monensina, já que esse aditivo não foi capaz de manter reduzida a emissão de metano com 24 horas de incubação, pelo

fato de que o volume desse gás foi três vezes maior no período mais longo de incubação.

De forma geral, foi observado que o extrato alcaloídico II propiciou uma produção de gás CH₄ no período de 12 e 24 h, após a inoculação, com fluido ruminal muito elevado e semelhante à produção de CH₄ do tratamento controle sem aditivo. O uso de extrato alcaloídico II apresentou maior produção de metano, quando comparado com a monensina para os dois tempos (12 e 24 h).

Abdalla et al. (2008) substituíram o farelo de soja por subprodutos da indústria de biodiesel, e observaram que o farelo de soja apresentou produção de metano de 15,3 mL/g MS e as tortas apresentaram produção de metano de 13,4; 11,1 11,8; 9,5 e 13,2 mL/g MS para algodão, dendê, mamona e pinhão manso, após 24 h de incubação, pela técnica de produção de gases *in vitro*. Visto que os subprodutos da indústria de biodiesel têm tendência em reduzir a mitigação entérica de metano. No presente trabalho, a produção de metano, nos tratamento contendo aditivos, apresentaram médias expressas em mL/g MS inferiores para farelo de trigo e feno de Tifton, no período de 12 e 24 h, sendo favorecido pela modificação da fermentação da matéria seca incubada com monensina e extrato I.

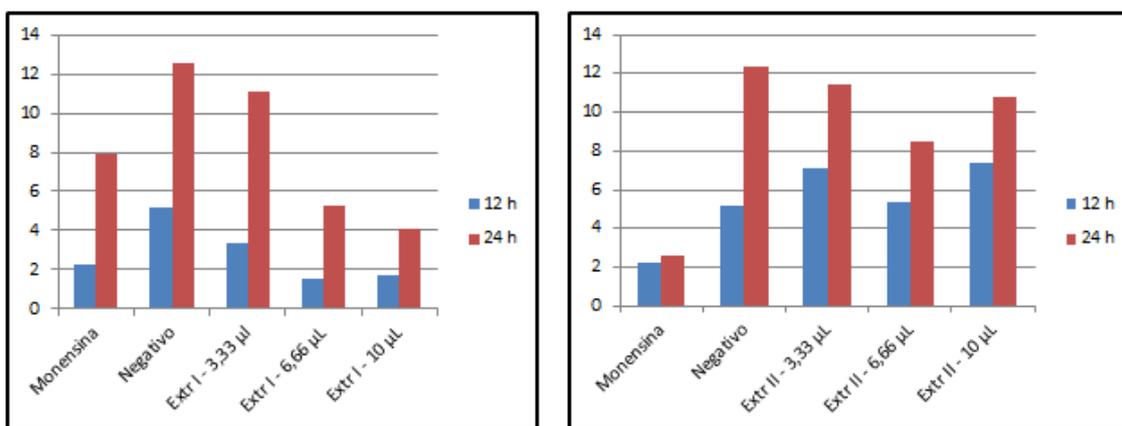


Figura 6 – Esquema de produção de metano entérico em incubação *in vitro* sobre a técnica semiautomática de produção de gases com farelo de trigo e feno de Tifton 85.

As concentrações de ácido láctico, acético e propiônico foram afetadas pelos extratos alcaloídicos I e II, adicionados ao meio com farelo de trigo, no período de 12 horas de incubação *in vitro* (Tabela 6). Para ácido láctico nos níveis 3,9 e 7,9 µg, apresentaram semelhança com o aditivo monensina, enquanto o tratamento com 12 µg e

controle negativo ($P < 0,05$) diferiram do mesmo, com valores médios superiores ao utilizar o extrato alcaloídico I.

Tabela 6 – Concentração de AGCC e ácido láctico *in vitro* com extratos alcaloídicos de *Prosopis juliflora* e monensina no período de 12 horas de incubação.

Parâmetro (mM)	Monensina 5 μ M	Extrato	Nível extrato alcaloídico de algaroba				CV (%)	Valor P Regressão ¹
			0 μ g	3,9 μ g	7,9 μ g	12 μ g		
Farelo de trigo								
Láctico	4,195*	I	5,245*	3,715	3,6	5,075*	6,2	0,0097 ²
	4,195*	II	5,245	5,735*	7,815*	2,670*	7,61	0,0004 ³
Acetato	9,100*	I	12,185	16,985*	9,255	11,52	9,5	0,0019 ⁴
	9,100*	II	12,185	12,235	16,315*	6,595	13,66	0,0050 ⁵
Propionato	2,750*	I	5,260*	5,985*	4,490*	3,605	11,77	0,0062 ⁶
	2,750*	II	5,260*	3,92	5,870*	3,055	13,72	0,0101 ⁷
Butirato	1,395	I	1,395	1,16	0,895	1,21	23,23	
	1,395	II	1,395	1,44	1,28	1,445	9,16	
Acet:prop	3,3:1	I	2,3:1	2,8:1	2,1:1	3,1:1		
	3,3:1	II	2,3:1	3,1:1	2,7:1	2,1:1		
Feno de Tifton 85								
Láctico	3,795*	I	3,365	2,985*	2,510*	3,79	7,12	0,0066 ⁸
	3,795	II	3,365	3,9	4,18	4,755	8,13	
Acetato	7,155	I	7,86	6,96	7,32	7,375	19,99	
	7,16	II	7,86	6,415	7,62	8,32	19,78	
Propionato	2,825	I	3,69	3,155	2,81	2,975	15,48	
	2,825	II	3,69	3,44	3,285	3,47	10,71	
Butirato	1,395	I	1,25	1,13	1,37	1,19	6,26	
	1,395	II	1,25	1,455	1,01	1,22	14,38	
Acet:prop	2,5:1	I	2,1:1	2,2:1	2,6:1	2,4:1		
	2,5:1	II	2,1:1	1,8:1	2,3:1	2,3:1		

*Médias seguidas pelo asterisco diferem pelo teste Dunnett ($P < 0,05$) do tratamento Monensina. ¹Análise de regressão considerando as médias dos tratamentos Monensina e extratos alcaloídicos (3,9; 7,9 e 12,0 μ g).

² $Y = 0,0304X^2 - 0,3021X + 4,2547$ ($R^2 = 0,95$); ³ $Y = -0,1051X^2 + 1,1975X + 3,8050$ ($R^2 = 0,80$); ⁴ $Y = 0,0673X^3 - 1,2944X^2 + 6,0467X + 9,1$ ($R^2 = 0,99$); ⁵ $Y = -0,2023X^2 + 2,3379X + 8,3598$ ($R^2 = 0,81$); ⁶ $Y = -0,0638X^2 + 0,7914X + 3,0351$ ($R^2 = 0,74$); ⁷ $Y = -0,0631X^2 + 0,8280X + 2,4700$ ($R^2 = 0,75$); ⁸ $Y = 0,0329X^2 - 0,4059X + 3,8646$ ($R^2 = 0,93$)

Com extrato alcaloídico II, verificou-se elevada concentração de ácido láctico para os tratamentos 0,0; 3,9 e 7,9 μ g, enquanto que, com a adição de 12 μ g, observou-se menor concentração ($P < 0,05$) de ácido láctico no meio de incubação ruminal *in vitro*.

Após a fermentação de 12 h do farelo de trigo com o nível 3,9 µg de extrato alcaloídico I, constatou-se diferença ($P < 0,05$) nas concentrações de ácidos acético e propiônico, que foram superiores, com uma diferença na razão acetato:propionato de 0,5 unidades a menos em relação ao meio contendo monensina. (Tabela 6). Para o nível de 7,9 µg, observou-se aumento na concentração de propionato e a de acetato permaneceu similar em comparação com a monensina, obtendo-se uma diferença para a razão acetato:propionato de 1,2 unidades.

Segundo Beuvink & Spoelstra (1992), a relação acetato/propionato pode interferir no volume de gases produzidos. Dessa forma, a provável maior produção de acetato, no nível 3,9 µg de extrato alcaloídico I, resultante da fermentação dos carboidratos do farelo de trigo, pode ter resultado na maior produção cumulativa de gases e de metano. O tratamento com 7,9 µg de extrato alcaloídico I com farelo de trigo foi eficiente para a redução de ácido acético, que contribuiu para diminuição na relação de acetato:propionato e também no decréscimo significativo da produção de metano, como pode ser observado na Tabela 4. Segundo Wolin & Miller (1988), se a relação acético:propiônico fosse 0,5, a perda de energia como CH_4 seria 0%, e se todos os carboidratos fossem fermentados em ácido acético sem produção de ácido propiônico, as perdas de energia como CH_4 chegariam a 33%. A relação acético:propiônico pode variar de 0,9 a 4 (ZOTTI & PAULINO, 2009).

Os ácidos graxos de cadeia curta (ácido láctico, acético, propiônico e butírico) e a relação acetato:propionato estão apresentados na Tabela 7, com concentrações crescentes de extratos alcaloídicos I e II de *Prosopis juliflora* e monensina, associados a farelo de trigo e feno de tifton 85, no período de incubação de 24 horas, pela técnica de fermentação *in vitro*.

A adição de 3,9 µg de extrato alcaloídico I com farelo de trigo, no meio de fermentação, durante 24 horas, reduziu as concentrações de ácido acético e láctico, responsáveis por liberação de íons de H^+ no meio ruminal. A manutenção da concentração de propionato, semelhante à utilização de monensina, apresentou menor relação acetato:propionato 2,3:1 vs. 2,9:1 para monensina. Vale ressaltar que a produção de metano foi semelhante à monensina para esse nível de extrato I com farelo de trigo (Tabela 5). Possivelmente, o uso do extrato alcaloídico I, neste nível, aumentou a retenção de energia fermentada *in vitro*, devido à alteração no padrão de fermentação,

com maior produção de propionato em relação ao acetato e decorrente da diminuição das perdas através de CH₄. O tratamento controle positivo (monensina sódica) apresentou concentração de ácido acético semelhante aos demais, porém, em menor concentração de propiônico, com 12 horas de incubação (Tabela 6), conseqüentemente, obteve-se uma relação acetato:propionato de 3,3:1; outro fator relevante é a concentração de ácido butírico, que não diferiu dos demais tratamentos, principalmente dos tratamentos que tiveram maior formação de ácido acético.

Tabela 7 – Concentração de AGCC e ácido láctico *in vitro* com extratos alcaloídicos de *Prosopis juliflora* e monensina no período de 24 horas de incubação.

Parâmetro (mM)	Monensina 5 µM	Extrato	Nível extrato alcaloídico de algaroba				CV (%)	Valor P Regressão ¹
			0 µg	3,9 µg	7,9 µg	12 µg		
Farelo de trigo								
Láctico	7,175*	I	6,485	3,385*	9,475	4,925	14,09	0,0003 ²
	7,175	II	6,485	5,595	8,07	5,47	12,59	
Acetato	16,610*	I	12,150*	9,960*	16,295	10,895*	11,08	0,0065 ³
	16,610*	II	12,15	13,005	18,225	11,370*	12,12	0,0223 ⁴
Propionato	5,545*	I	4,13	4,225	5,315	3,505*	10,94	0,0308 ⁵
	5,545*	II	4,130*	4,520*	6,800*	4,080*	6,19	0,0003 ⁶
Butirato	1,625	I	1,52	1,25	1,005	1,25	11,84	
	1,625	II	1,52	1,455	1,165	1,615	10,37	
Acet:prop	2,9:1	I	2,9:1	2,3:1	3,0:1	3,1:1		
	2,9:1	II	2,9:1	3,9:1	2,9:1	2,4:1		
Feno de Tifton 85								
Láctico	5,185*	I	3,635	3,115	4,925	4,81	13,844	
	5,185*	II	3,635	4,005	7,285	2,705	25,659	
Acetato	10,820*	I	8,605	11,365	11,3	9,62	17,580	
	10,820*	II	8,605	8,04	13,67	5,585	28,283	
Propionato	4,040*	I	3,725	2,875	3,885	3,98	9,986	
	4,040*	II	3,725	3,285	5,53	2,685	22,235	
Butirato	1,160*	I	1,28	1,19	1,16	1,165	19,148	
	1,160*	II	1,28	1,16	1,545	1,165	14,028	
Acet:prop	2,6:1	I	2,3:1	3,9:1	2,9:1	2,4:1		
	2,6:1	II	2,3:1	2,4:1	2,4:1	2,0:1		

*Médias seguidas pelo asterisco diferem pelo teste Dunnett (P<0,05) do tratamento monensina. ¹Análise de regressão considerando as médias dos tratamentos Monensina e extratos alcaloídico (3,9; 7,9 e 12,0 µg).

²Y = - 0,0534X³ + 0,9458X² - 3,8482X + 7,175 (R² = 0,99); ³Y = - 0,0645X³ + 1,1778X² - 5,3171X + 16,61 (R² = 0,99); ⁴Y = - 0,0541X³ + 0,9211X² - 3,6931X + 16,61 (R² = 0,99); ⁵Y = - 0,0138X³ + 0,2401X² - 1,0649X + 5,545 (R² = 0,99); ⁶Y = - 0,0215X³ + 0,3588X² - 1,3356X + 5,545 (R² = 0,99)

A relação acético:propionato pelo tratamento com monensina sódica pode está relacionada com a redução de bactérias celulolíticas no ambiente ruminal incubado e, em consequência, à menor degradabilidade da matéria seca (DAMS). Rivera et al. (2010), em seu trabalho com aditivos, relataram que, mesmo a monensina não apresentando resposta para produção de metano estimada *in vitro*, a quantificação de ácidos graxos de cadeia curta comprovou que a relação acetado:propionato foi menor, significando menor perda de energia. Segundo Tedeschi (2003), os aditivos como a monensina melhora até 7,5% a conversão alimentar e reduz em 4% a excreção de nitrogênio pelos animais.

Vale ressaltar que, em ambos os períodos de incubação, 12 e 24 horas, verificou-se que não houve diferença entre os aditivos estudados para as concentrações de ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação do feno de Tifton 85, exceto para a menor concentração de ácido láctico, nos níveis 3,9 e 7,9 μg do extrato alcaloídico I, em relação à monensina. Por outro lado, a produção de metano sofreu redução significativa, principalmente, para a quantidade de 12 μg do extrato I, nos dois tempos de incubação. Diante do exposto, pode-se inferir que o extrato alcaloídico de algaroba afeta as relações sintróficas no rúmen entre as bactérias celulolíticas e *archaeas* metanogênicas, resultando em menor atividade dessas últimas, pelo fato de não interferir na degradação da fibra.

A metodologia de extração por percolação com etanol e solução ácido-base foi mais eficiente para isolar as substâncias bioativas polares, que reagiram com os solventes utilizados. Os alcaloides da algaroba são classificados como piperidínicos, que têm caráter básico e possuem estruturas complexas que permitem seu uso como aditivo, que se assemelham ao desempenho de monensina na seletividade do crescimento de cepas microbianas no rúmen. Segundo Choudhary et al. (2005), o mecanismo de ação dos alcaloides piperidínicos sobre bactérias Gram positivas é devido à sua elevada citotoxicidade gerado pelo bloqueio dos canais de cálcio na membrana da célula, principalmente por causa das características anfotéricos destes alcaloides, os quais lhes permitem interagir de forma mais eficiente com a membrana celular e inibir os canais.

CONCLUSÕES FINAIS

O extrato alcaloídico I apresenta potencial semelhante à monensina sódica na redução da produção de gases totais, de metano e da razão acetato: propionato.

O aditivo extrato alcaloídico I de algaroba é eficiente na mitigação de metano, porém, para sua aplicação, estudos devem ser realizados em ensaios com animais ruminantes.

O nível 7,9 μg , no período de 12 h, e o nível 3,9 μg , no período de 24 h do extrato alcaloídico de vagens de algaroba, obtido pelo protocolo I, adicionado ao meio com farelo de trigo como substrato, demonstram maior potencial como redutor na produção de metano entérico sem comprometer a degradabilidade da matéria seca, sendo o nível de 12 μg mais eficiente, quando o feno de Tifton 85 é utilizado como substrato.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados demonstrados neste trabalho, pode-se afirmar que o extrato alcaloídico de *Prosopis juliflora* possui princípio ativo com eficiência para seletividade da microbiota ruminal, porém, deve-se desenvolver um protocolo de extração mais eficaz para extração de alcaloides de interesse e que elimine possíveis substâncias interferentes.

Os estudos de fermentação *in vitro* são encorajadores, mas ainda não suficientes para tirar conclusões sobre a ação desses alcaloides sobre a microbiota ruminal; e a aplicação dessas substâncias como agentes modificadores das relações sintróficas no rúmen, em longo prazo, só serão possíveis com aplicação de ferramentas de biologia molecular aos microrganismos do rúmen, submetidos aos seus efeitos ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L.; SILVA FILHO, J. C. da; GODOI, A. R. de; CARMO, C. de A.; EDUARDO, J. L. de P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p.260-258, 2008.

AQEEL, A.; KHURSHEED, A.K.; VIQARUDDIN, A.; SABIHA, Q. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. **Drug Res.**, v.39, p.652-655, 1989.

AOAC. **Official methods of analysis**. 15.ed., Arlington, 1990. 1117p.

BATATINHA, M. J. M. Investigations about toxic influences of *Prosopis juliflora* D.C: (Algarobeira) on cell cultures as well as on the fermentation in the rumen of cattle (in vitro). **Thesis, University of Veterinary Medicine**, Foundation Hannover, Germany, 1997.

BAUMGARDT, B. R. CASON, J. L. TAYLOR, M. W. Evaluation of forages in the laboratory. I. Comparative accuracy of several methods. **Journal of Dairy Science**. p.45-59, 1962.

BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; MARTINEZ, T.F.; MCALLISTER, T.A. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci.**, v.85, p.1990-1996, 2007.

BEUVINK, J. M. W.; KOGUT, J. Modeling gas-production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. **Journal of Animal Science**. 71: 1041 – 1046, 1993.

CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; ZAHEER-UL, H.; AZIM, M. K.; GHAYUR, M. N.; LODHY, M. A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B. M. Juliflorine: A potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 332, 1171–1179, 2005.

CROMPTON, L.A.; MILLS, J.A.N.; REYNOLDS, C.K.; France, J. Fluctuations in methane emission in response to feeding pattern in dairy cows. **Annals: 7º International Workshop**, Paris, 2009.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyzes of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

FIGUEIREDO, M. P.; MAURÍCIO, R. M.; PEREIRA, L. G. R.; REBOUÇAS, G. M. N.; MOREIRA, G. R.; SOUZA, L. F. Determinação da relação entre a pressão e volume

através da fermentação da raiz de mandioca tratada com ureia, feno de tifton 85 e silagem de milho para instalação da técnica *in vitro* de produção de gases. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIED. BRAS. DE ZOOTEC., 40, 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria, RS: 2003. CD-ROM.

GASTALDI, K.A. **Produção *in vitro* de metano, dióxido de carbono e oxigênio utilizando líquido ruminal de bovinos alimentados com diferentes rações.** UNESP. 2003. 104 p. Tese (Doutorado em Produção Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus e Jaboticabal.

HEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, p.185 – 197, 1994.

HUGHES, J.B.; SILVA, V.D.A.; SILVA, A.R.; SOUZA, C.S.; SILVA, A.M.M.; VELOZO, E.S.; BATATINHA, M.J.M.; COSTA, M.F.D.; TARDY, M.; EL-BACHÁ, R.S.; COSTA, S.L. Cytotoxicity effect of alkaloidal extract from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.43, p.50-58, 2006.

JANSSEN, P.H.; KIRS, M. Structure of the archaeal community of the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.3619-3625, 2008.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci.**, v.73, p.2483-2492, 1995.

KIM, E. J.; NEWBOLD, C. J.; SCOLLAN, N. D. Effect of water-soluble carbohydrate in fresh forage on growth and methane production by growing lambs. In: Advances in Animal Biosciences. **8º International Symposium on the Nutrition of Herbivores**, Aberystwyth, UK. 2. p 270. 2011.

LANA, R.P. **Sistema Viçosa de formulação de rações.** Viçosa: UFV, 60 p., 2000.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumosos ou concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254, 2001.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; Van SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, n.4, p.347-358, 1996.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D.; SCHABENBERGER, O. SAS® System for Mixed Models, 2nd Ed.; **SAS Institute, Inc.:** Cary, NC, USA, 2006.

MAO, H. -L.; WANG, J. -K.; ZHOU, Y. -Y.; LIU, J. -X. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. **Livest.Sc.**, 129. p. 56-62. 2010.

MAURICIO, R. M.; MOULD, F. L.; DHANOA, M. S. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**. v.79, p.321-330. 1999.

MAZZUCA, M.; KRAUS, W.; BALZARETTI, V. Evaluation of the biological activities of crude extracts from Patagonian *Prosopis* seeds and some of their active principles. **J. Herb Pharmacother.**, v.3, n.2, p.31-37, 2003.

MOREIRA, P. C.; REIS, R. B.; REZENDE, P. L. de P.WASCHECK, R. de C.; MENDONÇA, A. C. de; DUTRA, A. R. Produção cumulativa de gases e parâmetros de FRANCE avaliados pela técnica semiautomática *in vitro* de fontes de carboidratos de ruminantes. **Revista Brasileira Saúde Prod. An.**, v.11, n.2, p. 452-462, 2010.

MOULD, F. L., KLIEM, K. E., MORGAN, R., MAURICIO, R. M. *In vitro* microbial inoculum: a review of its function and properties. **Animal Feed Science and Technology** 123-124: 31-50, 2005.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y.; SHIGEMORE, H.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.). **Plant Growth Regulation**, v.44, n.3, p.207-210, 2004b.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; YAMADA, K.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Growth inhibitory alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) leaves. **Phytochemistry**, v.65, n.5, 587-591, 2004a.

ØRSKOV, E. R., I McDonald. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **J. Agric. Sci.**, 92(2):499- 503, 1979.

OTT-LONGONI, R.; VISWANATHAN, N.; HESSE, M. The structure of the alkaloid juliprosopine from *Prosopis juliflora* A. DC. **Helv. Chem. Acta**, 1980.

PEN, B.; TAKAURA, K.; YAMAGUCHI, S.; ASA, R.; TAKAHASHI, J. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* with or without b 1-4 galacto-oligosaccharides on ruminal fermentation, methane production and nitrogen utilization in sheep. **Anim. Feed Sci. Technol.**, 138. p. 75-88. 2007.

RIVERA, A. R.; BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. DE.; VELASQUEZ, P. T.; FRANCO, A. V. M.; FERNANDES, L. B. Fermentação ruminal e produção de metano em bovinos alimentados com feno de capim-Tifton 85 e concentrado com aditivos. **R. Bras. Zootec.**, v.39, n.3, p.617-624, 2010.

RUSSELL, J. B.; WALLACE, R. J. Energy yielding and consuming reactions, *In* Hobson, P. N.; Stewart, C. S. (eds): The Rumen Microbial Ecosystem. **Blackie Academic & Professional**, London. p. 246-282, 1997.

RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Cornell, USA, 2007. 119p.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, p.1-6. 1989.

SANTOS, E.T.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, C. F. P. G. et al. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on *in vitro* ruminal digestion, **International Journal of Molecular Science**, 2013.

SATTER, L.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal Nutrition**, v.32, n.2, p.199-208, 1974.

SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, n.6, p.1518-1527, 1984.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetic of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

SIMÕES, C. M. de O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. EDITORA DA UFSC, ed. 1ª, 821p, 1999.

SINGH, S.; SWAPNIL, S. K. V. Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. **Int. J. Pharma Sci. Res.**, v.2, p.114-120, 2011.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, D.J.; VAN SOEST, P.J., D. G. Fox, J. B. Russell,. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.

TABOSA, I. M.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; PAMPLONA, F. V.; ALMEIDA, R. N.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; SOUZA, J. C. A.; BARBOSA-FILHO, J. M. Isolamento biomonitorado de alcaloides tóxicos de *Prosopis juliflora* (algaroba). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.9-10, n.1, 2000.

TEDESCHI, L. O.; FOX, D. G.; TYLUTKI, T. P. Potential environmental benefits of inophores in ruminant diets. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 1591-1602, 2003.

VAN KESSEL A. G.; CHRISTENSEN C.; LAAVELD D . A. Modeling nutrient digestion and utilization in farm animals. **Journal of dairy science**. 86: 3796 – 3801, 1996.

Van SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2 ed. Ithaca: **Cornel University Press**. 1994. 476p.

VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteína e lipídeos em ração para ruminantes**. UFV. 1980. 98f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

WANG, C. J.; WANG, S. P.; ZHOU, H. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. **Anim. Feed Sci. Technol.**, 148. p. 157-166. 2009.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Microbe-microbe interactions. In: HOBSON, P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. New York: Elsevier, p.343-359, 1988.

ZOTTI, C. A.; PAULINO, V. T. Metano na produção animal: emissão e minimização de seu impacto. *Ecologia de Pastagens*. **Instituto de Zootecnia, APTA/SAA**, Nova Odessa/SP, 2009.