



**ANÁLISE MOLECULAR E DO PROCESSO
FERMENTATIVO DA MICROBIOTA RUMINAL
UTILIZANDO EXTRATOS ETANÓLICOS DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS**

LIZZIANE DA SILVA ARGÔLO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
CAMPUS JUVINO OLIVEIRA – ITAPETINGA-BAHIA**

**ANÁLISE MOLECULAR E DO PROCESSO
FERMENTATIVO DA MICROBIOTA RUMINAL
UTILIZANDO EXTRATOS ETANÓLICOS DE
LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS**

LIZZIANE DA SILVA ARGÔLO

**ITAPETINGA – BA
DEZEMBRO DE 2012**

LIZZIANE DA SILVA ARGÔLO

**ANÁLISE MOLECULAR E DO PROCESSO FERMENTATIVO DA MICROBIOTA
RUMINAL UTILIZANDO EXTRATOS ETANÓLICOS
DE LEGUMINOSAS ARBÓREAS TROPICAIS**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes,
para obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora:
Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Coorientadores:
João Carlos Teixeira Dias
Mauro Pereira de Figueiredo
Ronan Batista

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
2012

636.085 Argolo, Lizziane da Silva.

A741a Análise molecular e do processo fermentativo da microbiota ruminal utilizando extratos etanólicos de leguminosas arbóreas tropicais. / Lizziane da Silva Argolo. – Itapetinga-BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012.
131 fl.

Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - *Campus* de Itapetinga. Sob a orientação da Prof^a. D.Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira e co-orientador Prof. D.Sc. João Carlos Teixeira Dias; Prof. D. Sc. Mauro Pereira de Figueiredo; Prof.. D Sc. Ronan Batista.

1. Ruminantes – Alimentação – Leguminosas. 2. Nutrição animal – Ruminantes – Fisiologia digestiva. 3. Farelo de vagens de leguminosas – Alimentação – Bovinos – Digestibilidade *in vivo*. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Dias, João Carlos Teixeira. IV. Figueiredo, Mauro Pereira de. V. Batista, Ronan. VI. Título.

CDD(21): 636.085

Catálogo na Fonte:

Cláudia Aparecida de Souza– CRB 1014-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Ruminantes : Alimentação
2. Bovinos : Digestibilidade *in vivo*
3. Ruminantes : Fisiologia digestiva
4. Farelo de vagens de leguminosas : Nutrição animal

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

Campus Itapetinga-BA

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Análise Molecular e do Processo Fermentativo da Microbiota Ruminal utilizando Extratos Etanólicos de Leguminosas Arbóreas Tropicais”

Autor (a): Lizziane da Silva Argôlo

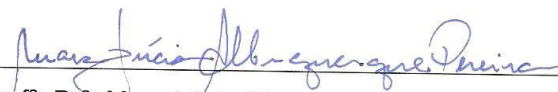
Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

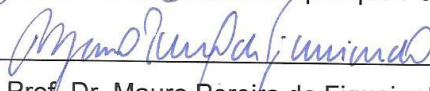
Co-orientador (a): Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias

Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo

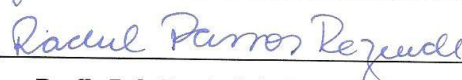
Prof. Dr. Ronan Batista

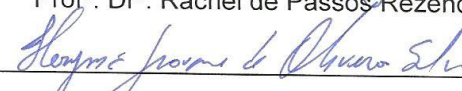
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:


Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira - UESB


Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo - UESB


Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias - UESB


Prof^a. Dr^a. Rachel de Passos Rezende - UESB


Prof. Dr. Herymá Giovane de Oliveira Silva - UESB

Data de realização: 30 de julho de 2012.

Praça Primavera, Nº 40, Bairro: Primavera –Telefone: (77) 3261-8628 - Fax: (77) 3261-8701
Itapetinga – BA – CEP: 45.700-000 e-mail:ppzootecnia@yahoo.com.br

Dedico

A Deus, meu Salvador,

À minha Vovó Linda (*In memoriam*), que
profetizou que meu pai seria Doutor e essa profecia
se estendeu a mim,

E aos meus Pais, Ronaldo e Marinez.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Fiel, Justo e Pai Amoroso, por Seu amor eterno, pelos Seus ensinamentos aplicados ao meu coração, e por Sua promessa cumprida, de que estaria comigo todos os dias. *Tu és minha fortaleza e força minha, meu Salvador!* Obrigada Pai!

Aos meus pais, Ronaldo e Marinez, que por muito me amarem, renunciaram aos seus próprios sonhos para que os meus fossem realizados, pelo amor, apoio, confiança e carinho em todos os momentos, pelo exemplo que vocês são em minha vida e por terem cuidado de João Pedro durante este período. Amo Muito Vocês!

Ao meu filhote lindo, o futuro “Cientista e Doutor” João Pedro, que é sempre o maior estímulo e motivação. Você é a minha herança, benção de DEUS! Te Amo Muito!

À minha família, meus irmãos queridos, Rogério, Ramon e Ronaldo. Em especial, a Ronaldo, pois sempre está disposto a me ajudar, não tenho palavras pra te agradecer tudo que faz para mim. Muito Obrigada! Às minhas cunhadas, sobrinhas, avós, tias, tios e meus primos. Muito Obrigada pelo amor, carinho e orações;

À Professora Mara Lúcia, minha orientadora, que acreditando no meu trabalho deu-me a liberdade e autonomia necessária, dividindo comigo as expectativas e conduzindo-me a refletir nas ideias que se transformaram em palavras. Minha especial admiração e gratidão. Que Deus a abençoe sempre!

Aos meus coorientadores, Professor João Carlos, Mauro e Ronan, pela orientação, incentivo e confiança, por terem acreditado que eu era capaz para realizar este trabalho. Obrigada, Deus os abençoe sempre!

À Professora e amiga Rachel, que me recebe sempre com carinho. Obrigada por me ajudar a expandir meus horizontes e a aprender cada vez mais. Você estará sempre no meu coração. Obrigada por tudo;

Ao Professor Herymá, pelo apoio e auxílio nas análises estatísticas. Muito Obrigada;

A todos os professores que participaram desta jornada, sempre solícitos, até mesmo fora do horário do curso, porque sem eles não haveria ideias enriquecedoras. Meus sinceros agradecimentos;

Aos colegas que se tornaram amigos: Luciana, Mauricea, Aracelle, Paulo Valter, Fábio, Alberti, Rogério, José Nobre, Antônio, Lucas, Aires, obrigada pelos momentos que passamos juntos, em especial, à Jacqueline, amiga em todos os momentos, meu muito obrigada, que Deus continue abençoando a ti e a sua família;

Aos colaboradores Camilla Flávia, Taialla, Lucas, Jeruzia, Edileusa, que muito contribuíram para realização deste trabalho;

Agradeço à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), à Coordenação de Laboratórios, ao meu amigo Wágner, que sempre esteve empenhado a me ajudar, quando precisei. Ao Sr. Raimundo e Aristides, sempre prontos a contribuir com meu trabalho. Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Nutrição Animal: Vera, Daniela, Juliana, Thiago, Pedro, Fernando, Cléia, Lara, Eduardo, Yann, João Paulo e Pablo Vieira, pela amizade e fundamental contribuição para a realização deste trabalho. Ao funcionário José e ao Professor Aureliano, pela disposição em ajudar sempre. À Professora Sibelli e Amanda, do Laboratório de Processamento de Leite e seus derivados, que me ajudaram com a liofilização dos extratos;

Agradeço à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), à GERLAB (Gerência de Laboratórios) e aos Laboratórios de Monitoramento Ambiental, Biotecnologia Microbiana e de Genética, pela fundamental contribuição para a realização deste trabalho;

Aos colegas de Laboratório da UESC: Bianca, Cristiane, Salatiel, Tharcilla, Miguel, Denise Sande, Thalys, Tizá, Tércia, Cida, Ana Cácia, Danyelle, Carol, Hellen, Aline, Louise, Sérgio, Eric, Elizandra, Roberta e Lidiane, pelo companheirismo, risadas, sugestões... Graças a Deus conheci vocês!!! Agradeço especialmente a Deus, pela vida de Gislaíne e Ronaldo, sem vocês eu não teria conseguido realizar as análises. Deus os abençoe grandemente!!

Quero agradecer aos meus amigos que sempre intercederam por mim a Deus. E agradecer especialmente Taline, Tia Nalva, Tio Maciel, Felipe e Alexandre, que me acolheram sempre que eu estive em Itapetinga; Alberto, Kêu, Tâmara, Thaís, Thiago, Joana, Daniel e Glínia, amigos que com carinho me receberam em seu lar, Vitória da Conquista, me deram apoio e carinho. Meu muito Obrigado! Amo Vocês e que Deus derrame infinitas bênçãos sobre vocês;

Aos meus amigos e irmãos do Pequeno Grupo “Teleios de Cristo”, pelo amor e orações. Em especial, à Elane Machado, amiga e irmã. *“Em todo o tempo ama o amigo; e na angústia nasce um irmão.”* (Pv.17:17);

Aos colegas do Instituto Federal Baiano, pelo apoio, incentivo e encorajamento. Em particular, a Nayron, Anadeje, Rosana, Rosely e Leandro, pelo apoio no dia da defesa. Em especial a James pelo seu respeito, carinho e dedicação para comigo, editando as imagens e sendo um forte apoio para a finalização do meu trabalho. Que Deus os abençoe ricamente!!

À CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa;

À FAPESB - Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia e UESB - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, pelo financiamento do projeto;

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na execução deste trabalho.

BIOGRAFIA

LIZZIANE DA SILVA ARGÔLO, filha de Ronaldo Costa Argôlo e Marinez Seára da Silva Argôlo, mãe de João Pedro Argôlo, nasceu na cidade de Ilhéus, Estado da Bahia, em 14 de abril de 1980.

Em Março de 1999, ingressou na Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC, na qual, em 2004, obteve o título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Em março de 2005, iniciou o Curso de Mestrado em Zootecnia, área de concentração em Produção de Ruminantes, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, obtendo o título de Mestre em Zootecnia no ano de 2008.

Em março de 2008, iniciou o Curso de Doutorado em Zootecnia, área de concentração em Produção de Ruminantes, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB.

*“Buscarás ao Senhor teu Deus, e o acharás,
quando o buscardes de todo o teu coração e de
toda a tua alma.”*
(Dt. 4.29)

*“Muitos confiam em carros e em cavalos, mas eu
confio no Senhor dos Exércitos.”*
(Sl. 20:7)

*“Quanto mais eu estudo a natureza mais fico
impressionado com a obra do Criador. Nas
menores de suas criaturas Deus colocou
propriedades extraordinárias...”*
Louis Pasteur

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 1	Experimento Piloto: Fermentação <i>in vitro</i> por Microbiota Ruminal de Bovinos com Níveis de Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais	
Tabela 1 -	Composição química (% matéria seca) dos Farelos de Vagem de <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Samanea tubulosa</i> e do farelo de trigo.....	47
Tabela 2 -	Tratamentos utilizando farelo de trigo associado aos extratos etanólicos obtidos do farelo de vagem de <i>Prosopis juliflora</i> (P), farelo de vagem de <i>Samanea saman</i> (S) e do farelo de vagem de <i>Samanea tubulosa</i> (T).....	48
Tabela 3 -	pH de fermentação <i>in vitro</i> de farelo de trigo associado a níveis crescentes de extrato etanólico, 0; 300 e 1200 mg/10 mL de <i>Prosopis juliflora</i> (P), <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T), após 8, 16 e 24 horas de incubação.....	55
CAPÍTULO 2	Efeito do Extrato Etanólico de Vagens de Leguminosas Tropicais sobre os Parâmetros Ruminais e Diversidade Bacteriana Ruminal	
Tabela 1 -	Composição química (% matéria seca) dos farelos de vagem de <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Samanea tubulosa</i> e de farelo de trigo.....	79
Tabela 2 -	Correlação entre variáveis de parâmetros fermentativos e cada componente principal (CP).....	91
CAPÍTULO 3	Fermentação <i>in vitro</i> por Microbiota Ruminal de Bovinos com Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais	
Tabela 1 -	Composição química dos Farelos de Vagem de <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Samanea tubulosa</i> e do farelo de trigo.....	105
Tabela 2 -	Produção de gases (PG; mL), degradação da matéria seca (DMS; %) e fator de partição (FP; $PG \text{ DMS}^{-1}$) do farelo de trigo com diferentes extratos etanólicos de farelo de vagens de <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Samanea tubulosa</i> e controle (DMSO;1% v/v), durante 96 h de incubação.....	112
Tabela 3 -	Comparação média dos parâmetros da cinética da digestão (mL g^{-1} de MS) dos extratos etanólicos de farelo de vagens de <i>Prosopis juliflora</i> , <i>Samanea saman</i> , <i>Samanea tubulosa</i> e controle (DMSO;1% v/v), durante 96 horas de incubação.....	113
Tabela 4 -	Correlação entre variáveis dos parâmetros de cinética da digestão, degradabilidade verdadeira da matéria seca (DMS) e metano (CH ₄) e cada componente principal (CP).....	119
ANEXO D	Farelo de Algaroba na alimentação de Cabras Mestiças Anglo Nubianas: Comportamento Ingestivo, Parâmetros Ruminais e Caracterização Molecular da Diversidade Microbiana Ruminal	
Tabela 1 -	Composição do concentrado em ingrediente nutricional (% MN).....	137
Tabela 2 -	Composição química do volumoso, dos concentrados e das dietas (% MS).....	138
Tabela 3 -	Médias para os consumos de nutrientes em função dos níveis de farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho no concentrado para cabras.....	144

Tabela 4 -	Correlação entre variáveis de consumo de nutrientes e cada componente principal (CP).....	146
Tabela 5 -	Médias de quadrados mínimos, erro padrão da média (EPM) e indicativos de significância para os efeitos dos contrastes sobre o comportamento ingestivo em cabras alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.....	148
Tabela 6 -	Médias de quadrados mínimos, erro padrão da média e indicativos de significância para os efeitos dos contrastes das eficiências de alimentação e ruminação em cabras alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.....	149
Tabela 7 -	Correlação entre variáveis de comportamento ingestivo e cada componente principal (CP).....	152
Tabela 8 -	Médias de quadrados mínimos, erro padrão da média e indicativos de significância para os efeitos dos contrastes das concentrações de acetato, propionato, butirato em cabras alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.....	154
Tabela 9 -	Correlação entre variáveis de parâmetros fermentativos e cada componente principal (CP).....	155

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 Experimento Piloto: Fermentação <i>in vitro</i> por Microbiota Ruminal de Bovinos com Níveis de Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais	
Figura 1 -	Degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS; %) e biomassa microbiana (mg/g de MS) de amostras contendo níveis crescentes de extrato etanólico, 0; 300 e 1200 mg/10 mL de <i>Prosopis juliflora</i> (P), <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T), após 8; 16 e 24 horas de incubação.....
	56
Figura 2 -	Produção de gases cumulativa da fermentação <i>in vitro</i> de farelo de trigo associado a concentrações crescentes (300 e 1200 mg/ 10 mL) de extrato etanólico de <i>Prosopis juliflora</i> (P), de extrato etanólico de <i>Samanea saman</i> (S) e de extrato etanólico de <i>Samanea tubulosa</i> (S) e tratamentos controle com dimetilsulfóxido (C/DMSO) e sem dimetilsulfóxido (S/DMSO) até 24 horas de incubação.....
	57
Figura 3 -	Produção não cumulativa de gases da fermentação <i>in vitro</i> de farelo de trigo associado a concentrações crescentes (300 e 1200 mg/ 10 mL) de extrato etanólico de <i>Prosopis juliflora</i> (P), de extrato etanólico de <i>Samanea saman</i> (S) e de extrato etanólico de <i>Samanea tubulosa</i> (S) e tratamentos controle com dimetilsulfóxido (C/DMSO) e sem dimetilsulfóxido (S/DMSO) até 24 horas de incubação.....
	58
Figura 4 -	Superfície de resposta e curva de contorno para produção não cumulativa de gases (mL/h) durante a fermentação de amostras contendo concentrações crescentes extrato de <i>Prosopis juliflora</i>
	59
Figura 5 -	Superfície de resposta e curva de contorno para produção não cumulativa de gases (mL/h) durante a fermentação de amostras contendo concentrações crescentes de extrato de <i>Samanea saman</i>
	59
Figura 6 -	Superfície de resposta e curva de contorno para produção não cumulativa de gases (mL/h) durante a fermentação de amostras contendo concentrações crescentes de extrato de <i>Samanea tubulosa</i>
	60
Figura 7 -	Riqueza de bandas para os domínios <i>Bacteria</i> e <i>Archaea</i> considerando os níveis de concentração, 300; 600 e 1200 mg/10 mL, dos extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> (P); <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T).....
	62
Figura 8 -	Perfil de bandas da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) a partir de PCR amplificado com V3-16S DNAr da comunidade bacteriana com base na adição de farelo de trigo associado com diferentes níveis (1-3: 300; 600 e 1200 mg/10 mL) de extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> (P), <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T), após incubação (6, 12, 24, 36 e 96 h).....
	62
Figura 9 -	Perfil de bandas da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) a partir de PCR amplificado para a comunidade de arqueas metanogênicas com base na adição de farelo de trigo associado com diferentes níveis (1-3: 300; 600 e 1200 mg/10 mL) de extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> (P), <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T), após incubação (6, 12, 24, 36 e 96 h).....
	63
Figura 10 -	Avaliação das comunidades microbianas das concentrações 300; 600 e 1200 mg/10 mL (1-3) dos extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> (P); <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T), após diferentes tempos de incubação (A-E: 6, 12, 24, 36 e 96 h), determinados por análise de PCR-DGGE para bactérias. (A) Análise de agrupamento com base no perfil de

	bandas da DGGE gerados com UPGMA. (B) UPGMA por Extrato Etanólico. (C) Diagramas de Venn por Extrato Etanólico, números nos círculos e nas interseções indicam números de bandas compartilhadas e bandas específicas, respectivamente.....	65
Figura 11 -	Avaliação das comunidades microbianas das concentrações 300; 600 e 1200 mg/10 mL (1-3) dos extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> (P); <i>Samanea saman</i> (S) e <i>Samanea tubulosa</i> (T), após diferentes tempos de incubação (A-E: 6, 12, 24, 36 e 96 h), determinados por análise de PCR-DGGE para arqueas. (A) Análise de agrupamento com base no perfil de bandas da DGGE gerados com UPGMA. (B) UPGMA por Extrato Etanólico. (C) Diagramas de Venn por Extrato Etanólico, números nos círculos e nas interseções indicam números de bandas compartilhadas e bandas específicas, respectivamente.....	66
CAPÍTULO 2 Efeito do Extrato Etanólico de Vagens de Leguminosas Tropicais sobre os Parâmetros Ruminais e Diversidade Bacteriana Ruminal		
Figura 1 -	pH ruminal em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao: DMSO (Controle); extrato etanólico de <i>P. juliflora</i> (P); extrato etanólico de <i>S. saman</i> (S); extrato etanólico de <i>S. tubulosa</i> (T).....	86
Figura 2 -	Concentrações de nitrogênio amoniacal em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao: DMSO (Controle); extrato etanólico de <i>P. juliflora</i> (P); extrato etanólico de <i>S. saman</i> (S); extrato etanólico de <i>S. tubulosa</i> (T).....	87
Figura 3 -	Concentrações de acetato (A), propionato (B), butirato (C) e relação acetato:propionato (D) em mM.....	89
Figura 4 -	Proporções molares da fermentação <i>in vitro</i> do farelo de trigo associado ao: DMSO (1) e aos extratos etanólicos de <i>P. juliflora</i> (2); <i>S. saman</i> (3) e <i>S. tubulosa</i> (4).....	90
Figura 5 -	Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e dos parâmetros de fermentação.....	91
Figura 6 -	Dendograma Jaccard gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com <i>primers</i> para a região V3 do 16S do rRNA para bactérias.....	93
Figura 7 -	Riqueza de bandas para o domínio <i>Bacteria</i> considerando os tempos de incubação (h) com adição dos extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> ; <i>Samanea saman</i> e <i>Samanea tubulosa</i>	93
Figura 8 -	Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para bactérias.....	95
CAPÍTULO 3 Fermentação <i>in vitro</i> por Microbiota Ruminal de Bovinos com Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais		
Figura 1 -	Produção de gases oriunda da degradação de CNF e CF do farelo de trigo associado ao: (A) DMSO; (B) extrato etanólico de <i>P. juliflora</i> ; (C) extrato etanólico de <i>S. saman</i> ; (D) extrato etanólico de <i>S. tubulosa</i> em função do tempo de incubação.....	115
Figura 2 -	Produção total de gases em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao (Controle) DMSO; (P) extrato etanólico de <i>P. juliflora</i> ; (S) extrato etanólico de <i>S. saman</i> ; e (T) extrato etanólico de <i>S. tubulosa</i>	115

Figura 3 -	Comportamento da produção de metano, expressa em mL/ 100g de matéria seca verdadeiramente degradada, em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao DMSO (Controle); extrato etanólico de <i>P. juliflora</i> (P); extrato etanólico de <i>S. saman</i> (S); e extrato etanólico de <i>S. tubulosa</i> (T).....	116
Figura 4 -	Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e dos parâmetros de cinética da digestão, degradabilidade verdadeira da matéria seca (DMS) e metano (CH ₄).....	118
Figura 5 -	Dendograma Jaccard gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com iniciadores específicos para arqueas (1100 e 1400 do 16S rRNA). Em que, P – Extrato Etanólico de <i>Prosopis juliflora</i> ; S – Extrato Etanólico de <i>Samanea saman</i> ; T - Extrato Etanólico de <i>Samanea tubulosa</i> ; 1-5 equivalem aos tempos de incubação (6, 12, 24, 36 e 96h).....	121
Figura 6 -	Riqueza de bandas para o domínio <i>Archaea</i> considerando os tempos de incubação (h) com adição dos extratos etanólicos de <i>Prosopis juliflora</i> ; <i>Samanea saman</i> e <i>Samanea tubulosa</i>	121
Figura 7 -	Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para arqueas.....	122
 ANEXOS		
ANEXOS A	<i>Prosopis juliflora</i>	129
ANEXOS B	<i>Samanea saman</i>	130
ANEXOS C	<i>Samanea tubulosa</i>	131
ANEXOS D	Farelo de Algaroba na Alimentação de Cabras Mestiças Anglo Nubianas: Comportamento Ingestivo, Parâmetros Ruminais e Caracterização Molecular da Diversidade Microbiana Ruminal	
Figura 1 -	Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e das variáveis de consumo de nutrientes.....	146
Figura 2 -	Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e das variáveis de comportamento ingestivo.....	152
Figura 3 -	pH ruminal em cabras fistuladas, não lactantes, alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.....	153
Figura 4 -	Concentração de N-NH ₃ em cabras fistuladas, não lactantes, alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.....	153
Figura 5 -	Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e dos parâmetros de fermentação.....	155
Figura 6 -	Dendograma Raup-Crick gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com iniciadores 16S V3 para bactérias, representando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).....	157

Figura 7 - Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para bactérias, considerando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).....	157
Figura 8 - Riqueza de bandas para bactérias e arqueas considerando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).....	157
Figura 9 - Dendograma Jaccard gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com <i>primers</i> específicos (1100 e 1400 do 16S rRNA) de arqueas, representando apenas os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).....	159
Figura 10 - Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para arqueas, considerando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).....	159

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 <i>Potencialidades do uso de extratos vegetais como aditivos no arraçoamento de ruminantes</i>	25
2.2 <i>Microbiota gastrintestinal de animais: limitações, técnicas moleculares de identificação e estudo de microrganismos de comunidades complexas</i>	26
2.3 <i>Técnica semiautomática in vitro de produção de gases</i>	31
3. REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 1	
Experimento Piloto: Fermentação <i>in vitro</i> por Microbiota Ruminal de Bovinos com Níveis de Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4. CONCLUSÕES	67
5. REFERÊNCIAS	68
CAPÍTULO 2	
Efeito do Extrato Etanólico de Vagens de Leguminosas Tropicais sobre os Parâmetros Ruminais e Diversidade Bacteriana Ruminal	74
RESUMO	75
ABSTRACT	76
1. INTRODUÇÃO	77
2. MATERIAL E MÉTODOS	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4. CONCLUSÕES	96
5. REFERÊNCIAS	97
CAPÍTULO 3	
Fermentação <i>in vitro</i> por Microbiota Ruminal de Bovinos com Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais	100
RESUMO	101
ABSTRACT	102
1. INTRODUÇÃO	103
2. MATERIAL E MÉTODOS	105
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
4. CONCLUSÕES	123
5. REFERÊNCIAS	124

ANEXOS	
ANEXO A – <i>Prosopis juliflora</i>	129
ANEXO B – <i>Samanea saman</i>	130
ANEXO C – <i>Samanea tubulosa</i>	131
ANEXO D	
Farelo de Algaroba na Alimentação de Cabras Mestiças Anglo Nubianas: Comportamento Ingestivo, Parâmetros Ruminais e Caracterização Molecular da Diversidade Microbiana Ruminal	132
RESUMO	133
ABSTRACT	134
1. INTRODUÇÃO	135
2. MATERIAL E MÉTODOS	137
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	144
4. CONCLUSÕES	160
5. REFERÊNCIAS	161
ANEXO E - Determinação do Nitrogênio Amoniacal	164

INTRODUÇÃO
E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

As vantagens, em termos de produção animal, da inclusão de leguminosas em pastagens têm sido descritas em inúmeros trabalhos. Esses incluem o aumento na produção animal, como resultado do incremento nos níveis proteicos e/ou energéticos, na digestibilidade e no consumo da forragem disponível; melhoria na distribuição da produção da pastagem ao longo do ano; maior concentração de minerais, especialmente de cálcio, e aumento na fertilidade do solo pela adição de nitrogênio ao sistema solo-planta-animal. Recentemente, vários trabalhos têm abordado a importância das leguminosas, especialmente, as tropicais, e da sua utilização na alimentação animal em regiões quentes (ou tropicais).

Segundo Schultze-Kraft e t'Mannetje (2000), a avaliação de leguminosas tropicais é distinta das espécies temperadas, uma vez que as primeiras representam espécies essencialmente não domesticadas, selecionadas a partir de populações silvestres, sobre as quais pouco se conhece ao nível taxonômico, ecológico, reprodutivo e, principalmente, nutricional. A diversidade de leguminosas tropicais aptas a serem usadas como forrageiras é muito maior do que de leguminosas temperadas.

Em regiões semiáridas, a condição de estação seca se caracteriza pelo fato desta condição perdurar praticamente todo o ano, isso, juntamente com a exploração indiscriminada dos recursos forrageiros nativos e/ou introduzidos, são fatores responsáveis pelo baixo desempenho dos rebanhos (PEDREIRA e PRIMAVESI, 2008). Logo, o uso de leguminosas como fonte de nutrientes durante a estação seca tem resultado em aumentos de produção animal, estimulando sua utilização, principalmente, as espécies perenes e nativas.

Leguminosas nativas ou adaptadas, utilizadas pelos rebanhos nas áreas mais secas do Nordeste Brasileiro, não deixam dúvida acerca do potencial produtivo e econômico da pecuária na região. Diversas pesquisas têm relatado uma resposta positiva do uso de leguminosas na alimentação de ruminantes (MAHGOUB et al., 2005a; MAHGOUB et al., 2005b; BABAYEMI e BAMIKOLE, 2006; BABAYEMI et al., 2006; ARGÔLO et al., 2010; BABAYEMI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012), principalmente associando-se alguma espécie leguminosa ao concentrado.

Estudos de espécies leguminosas também vêm despertando a atenção para a pesquisa, tendo em vista a produção de vagens e a procura dessas porções das plantas pelos animais, além da conservação dos recursos naturais de produção e preservação da natureza, assim como a valorização da agricultura familiar. Este é o caso das espécies *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*, plantas forrageiras produtoras de alimento de alto valor energético, com teor proteico que supera as gramíneas (LORENZI, 1998; BATISTA et al., 2002).

Leguminosas apresentam alto teor de proteína, em geral, maior do que o das gramíneas. Porém, o valor nutritivo das leguminosas forrageiras é prejudicado devido à presença de toxinas e fatores antinutricionais, como polifenólicos (taninos), aminoácidos não-proteicos, alcaloides, saponinas ou outros compostos que limita sua utilização como alimento para animais (KAITHO et al., 1998; SATISH et al., 1999; BHATTA et al., 2007). Dessa forma, além dos estudos sobre os efeitos desta fonte de alimento sobre a produção de leite e de carne, é muito importante também avaliar seus efeitos sobre a microbiota ruminal, a qual pode interferir na saúde do rebanho, uma vez que estas plantas apresentam várias classes de substâncias tóxicas capazes de induzir toxicidade sistêmica em animais. Entretanto, faltam informações científicas sobre os microrganismos ruminais capazes de metabolizar estes compostos e reduzir seus efeitos tóxicos.

Diversas técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos, surgindo a possibilidade de que bactérias, estritamente anaeróbicas, fossem cultivadas. Entretanto, os métodos de cultivo são geralmente laboriosos, requerem tempo e selecionam somente uma pequena fração da diversidade microbiana total presente no trato gastrintestinal (COUTINHO et al., 1999).

O estudo da diversidade genética de comunidades microbianas tem se baseado, primeiramente, em análises de ácidos nucleicos da comunidade microbiana total, e para estes ácidos nucleicos serem obtidos, necessita-se de uma estratégia eficaz para análise, extração e purificação (COUTINHO et al., 1999). Entretanto, a extração de DNA de diferentes materiais heterogêneos não é simples, não existindo protocolo universalmente aplicável para a extração de DNA no estudo de comunidades microbianas complexas.

As técnicas moleculares podem ser empregadas no estudo da diversidade microbiana, a partir da análise do gene que codifica o RNA ou DNA ribossomal (rRNA ou rDNA). No entanto, os métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) têm a vantagem de fornecer informações diretas da estrutura e composição da comunidade microbiana, sendo uma eficiente estratégia para descrever a biodiversidade microbiana dentro das amostras ambientais. Dentre as técnicas mais utilizadas, a DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) tem sido amplamente empregada (i) no estudo da ecologia microbiana molecular, aliada à extração direta de DNA da comunidade, (ii) em estudos filogenéticos dos membros das comunidades e (iii) no estudo da dinâmica de populações específicas em função de variações ambientais ou das condições operacionais de um sistema (COUTINHO et al., 1999; TESKE et al., 1996; MUYZER et al., 1993).

Diante da necessidade de estudos sobre a utilização da vagem de *P. juliflora*, *S. saman*, *S. tubulosa* como recursos alimentares para animais e do conhecimento da microbiota ruminal, os objetivos deste trabalho foram:

- CAPÍTULO I:
 - Avaliar o potencial de utilização dos extratos etanólicos de farelos de vagens das leguminosas *P. juliflora* (Sw.) D.C., *S. saman* e *S. tubulosa* (Benth.) Barneby & Grimes como aditivo natural para manipulação da microbiota do rúmen, visando a redução de perda de energia e/ou proteína do sistema ruminal e estabelecer uma concentração mais adequada para estudos posteriores.
- CAPÍTULO II:
 - Avaliar os parâmetros da cinética de degradação ruminal das frações de carboidratos fibrosos e não fibrosos sobre a diversidade de arqueas metanogênicas no rúmen e sobre a degradação *in vitro* da matéria seca, utilizando extratos etanólicos obtidos de farelo de vagem de *P. juliflora*, *S. saman* e *S. tubulosa* como aditivos alimentares.
- CAPÍTULO III:
 - Avaliar a utilização de extratos etanólicos de *P. juliflora*, *S. saman* e *S. tubulosa* sobre parâmetros ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e AGV) e sobre a diversidade bacteriana ruminal, utilizando o método de fermentação *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Diversas pesquisas em nutrição de ruminantes têm focado os microrganismos do rúmen, os quais são os principais responsáveis pelo processo de digestão de alimentos, além da função protetora que exercem, agindo no controle de populações de microrganismos patogênicos. O grande desafio, no entanto, é fornecer as condições necessárias para o desenvolvimento da população microbiana no rúmen, potencializando as habilidades de classes específicas de microrganismos, que poderão contribuir para o aumento da eficiência alimentar.

A microbiologia ruminal é extremamente diversificada, devido ao grande número de organismos presentes. Estes microrganismos, predominantemente bactérias, arqueas, protozoários e fungos, dependem do ruminante para disponibilizar as condições fisiológicas necessárias para sua existência. Por sua vez, os mesmos são essenciais para digestão e fermentação de grandes quantidades de alimentos fibrosos que são consumidos pelos ruminantes que, de outro modo, não poderiam utilizar tais alimentos de forma mais eficaz (KRAUSE et al., 1999). A hidrólise da fibra dietética, por intermédio da microbiota, dentro da câmara ruminal leva à fermentação de carboidratos solúveis a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), mais notadamente acetato, propionato e butirato (DALY et al., 2001), que são utilizados pelo ruminante para cobrir suas próprias necessidades energéticas, ao proporcionar um ambiente adequado a estes microrganismos (YOKOYAMA e JOHNSON, 1993).

Além disso, os microrganismos do rúmen são fonte de proteína de excelente qualidade. A proteína microbiana sintetizada no rúmen fornece uma fonte proteica barata, principalmente em locais onde a suplementação proteica é mais escassa. Portanto, a maximização da produção de proteína microbiana é uma forma efetiva e sustentável para um melhor desempenho produtivo de ruminantes. Logo, o aumento da eficiência biológica da síntese de proteína microbiana no rúmen é uma maneira para melhorar o custo de produção (TIMMERMANS Jr. et al., 2000).

A concentração de proteína bruta e o valor energético de resíduos de safra de grãos e gramíneas de baixa qualidade estão abaixo do requerimento animal e os brotos de leguminosas, que servem de alimentação para o rebanho, têm sido incorporados nos sistemas nutricionais para melhorar o estado nutricional de ruminantes. As folhas e frutos de leguminosas podem ser usados como suplementos proteicos para ruminantes e são comumente usados como alimentos em muitos sistemas agrícolas. Para tanto, é de suma importância conhecer o potencial de plantas nativas ou introduzidas e que são adaptadas ao clima da região do Nordeste, com o intuito de aproveitar o seu potencial para alimentação humana ou dos animais. O desenvolvimento da pecuária no semiárido tem uma estreita relação com o crescimento e disponibilidade de plantas

forrageiras, tanto em relação à porção vegetativa como das vagens, quando se trata de leguminosas.

O Nordeste Brasileiro tem por característica ser um ecossistema não equilibrado, por isso, apresenta escassez de forragem, em quantidade e em qualidade, nas épocas secas, sendo isso um fator limitante da produtividade dos rebanhos dessa região.

A vegetação nativa é rica em espécies forrageiras em seus três estratos: arbóreo, arbustivo e herbáceo. Estudos mostram que mais de 70% das espécies botânicas da caatinga participam significativamente da dieta dos ruminantes domésticos. No entanto, diversas dessas plantas ainda não foram efetivamente estudadas quanto aos seus potenciais e limitações para uso na alimentação animal (SOUZA e ESPÍNDOLA, 2000; ZANINE et al., 2005). As leguminosas arbóreas e arbustivas têm se destacado em nível mundial como uma fonte econômica de proteína para a produção animal. No semiárido nordestino tem-se destacado o uso de leguminosas em cultivo isolado como forma de reduzir a escassez de forragem nas épocas secas do ano.

A algarobeira (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) é uma planta arbórea, não oleaginosa, também da família Leguminosae, subfamília Mimosoideae (PIRES, 1985; QUINTANS, 2001), nativa do Peru, Chile e Argentina. Tem sido disseminada pela América Central e do Norte, introduzida em áreas áridas onde os índices pluviométricos estão em torno de 200 mm/ ano. É utilizada no combate à desertificação como um fixador de nitrogênio e para alimentação de rebanhos (MAHGOUB et al., 2005b). Foi introduzida no Brasil em 1942, na região Nordeste, onde se apresenta bastante promissora tanto para fins madeireiros como forrageiros (PIRES, 1985), tornando-se uma importante produtora de alimento de alto valor nutritivo, existindo cerca de 150.000 ha de área plantada (QUINTANS, 2001).

A algarobeira produz grande quantidade de vagens de excelente palatabilidade e boa digestibilidade, esta produção pode variar até valores acima de 400 kg por árvore (BATISTA et al., 2002). A algaroba apresenta, em sua composição química, 25-28% de glicose, 11-17% de amido, 7-11% de proteínas e 14-20% de ácidos orgânicos, pectinas e demais substâncias (SILVA et al., 2001). Além disso, o farelo da vagem de algaroba apresenta 40,2% de FDN, 50,0-64,0% de carboidratos solúveis em detergente neutro (CSDN), sendo que açúcares solúveis e amido perfazem 43% da matéria seca (MS) total (SILVA et al., 2001; MAHGOUB et al., 2005a), consistindo, dessa forma, uma fonte importante de CSDN para formulação de dietas para cabras leiteiras mais especializadas.

Os extratos das sementes e folhas de *Prosopis juliflora* têm demonstrado diversos efeitos farmacológicos *in vitro* como propriedade antibacteriana (AQEEL et al., 1989; SATISH et al., 1999), antifúngica (AHMAD et al., 1989; KAUSHIK et al., 2002) e antiinflamatória (AHMAD et al., 1989). Estas propriedades foram atribuídas à presença dos alcaloides (AHMAD et al., 1989). 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, e a atividade antifúngica foi percebida quando a extração foi realizada com metanol e água.

Em estudos realizados por Argôlo et al. (2010), alguns parâmetros de fermentação ruminal (pH, nitrogênio amoniacal e relação acetato:propionato) foram avaliados em cabras leiteiras alimentadas com farelo da vagem de algaroba (FVA) (*Prosopis juliflora*). Evidenciou-se que houve redução da relação acetato:propionato no líquido ruminal e que o fluxo intestinal de compostos nitrogenados microbianos decresceram linearmente com o aumento dos teores de FVA nas dietas, sem que houvesse alteração no consumo de matéria seca dos animais.

Outras espécies leguminosas vêm despertando a atenção para sua utilização na alimentação animal, é o caso da *Samanea tubulosa* (Benth.) Barneby & Grimes (sinonímia botânica *Calliandra tubulosa*; *Pithecellobium saman* var. *acutifolium*; *Pithecellobium venosum*) comumente chamada de alfarobo, samaneiro, abobreira, ou farinha-seca, e da *Samanea saman* (Jacq.) Merr. (*Albizia saman*; *Mimosa saman* Jacq.; *Inga saman* Willd.; *Pithecolobium saman* Benth.; *Enterolobium saman* Prain.) conhecidas como saman, acacia, árvore de chuva, esse gênero é conhecido popularmente como sete-cascas, bordão-de-velho e do inglês “macaco pod” (UKOHA et al., 2011). São plantas leguminosas pertencentes à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, e estão globalmente distribuídas em regiões tropicais, cuja ocorrência, no Brasil, abrange a Bahia e se mostra bastante adaptada à região. Ocorre preferencialmente em capoeiras e áreas abertas como colonizadoras em várzeas aluviais e beira de rios, onde o solo é bem suprido de água e de boa fertilidade. Segundo Lorenzi (1998), produzem anualmente moderada quantidade de sementes viáveis, disseminadas por animais domésticos. São promissoras devido ao crescimento rápido no campo e produção anual de vagens com elevado valor energético/proteico, que coincide com o período de estiagem. Em algumas regiões, são as árvores preferidas dos fazendeiros, pois além de fornecer sombreamento nas pastagens, as vacas apreciam muito seus frutos que contém uma espécie de mel amargo.

O valor nutritivo das leguminosas forrageiras é prejudicado devido à presença de toxinas e fatores antinutricionais, como polifenólicos (taninos), aminoácidos não proteicos, alcaloides, saponinas ou outros compostos que limitam sua utilização como alimento para animais (KAITHO et al., 1998; SATISH et al., 1999; BHATTA et al., 2007). Apesar da falta de informações científicas sobre os efeitos tóxicos que estes compostos podem ter sobre os microrganismos ruminais e como estes são capazes de metabolizá-los. Sabe-se, no entanto, que o tanino forma um complexo com a proteína da dieta e enzimas endógenas, reduzindo o suprimento de nitrogênio (N) ao animal (GETACHEW et al., 2000).

De acordo com Sawal et al. (2004), as vagens de algaroba apresentam baixos níveis de tanino tóxico ao animal. No entanto, substâncias alcaloides foram isoladas como 3'-oxo-juliprosopina, secojuliprosopinal, uma mistura de 3-oxo- e 3'-oxo-juliprosina (NAKANO et al.,

2004a), além da juliprosina e juliprosopina, que são inibidoras de crescimento de plantas (NAKANO et al., 2004b). Outro alcaloide isolado da *P. juliflora*, denominado julifloricina, exerce atividade antimicrobiana significativa, principalmente sobre bactérias Gram positivas. Este efeito foi comparado à ação da benzil penicilina, gentamicina e trimetropina (AQEEL et al., 1989; NAKANO et al., 2004b). Intoxicação por algaroba, conhecida popularmente como “cara torta”, já foi relatada em ruminantes nos Estados Unidos, Peru e no Brasil, esta doença é caracterizada por alterações neuromusculares, observada principalmente durante a ruminação (TABOSA et al., 2000; HUGHES et al., 2006). A ingestão a longo prazo de algaroba em dietas de gado pode resultar em morte (COOK et al., 2008). No entanto, Mahgoub et al. (2005b) não observaram manifestações da doença em caprinos, possivelmente devido ao curto período de alimentação e/ou à utilização de menor proporção da vagem na dieta, que foi no máximo de 300 g/ kg, logo a intoxicação pode ser evitada.

Ao mesmo tempo, Choudhary et al. (2005) mostraram que o alcaloide juliflorina é um inibidor não competitivo da acetilcolinesterase e também apresenta atividade bloqueadora dos canais de Ca^{2+} que poderia envolver espasmos neuromusculares observados em animais intoxicados por *P. juliflora*. No entanto, não existe conhecimento sobre a ação que estes alcaloides exercem sobre a microbiota ruminal.

Na prática folclórica na Jamaica, da folha de *S. saman* é feita uma infusão para o tratamento de pressão arterial e também como laxante, e as sementes são mastigadas na África tropical para tratar a inflamação da gengiva e garganta. Além disso, outras partes da árvore de chuva são utilizadas como remédio para o resfriado, diarreia, dor de cabeça, doenças intestinais, dor de estômago e até mesmo câncer (UKOHA et al., 2011).

Os extratos das folhas e cascas de *S. saman* têm demonstrado efeitos tóxicos *in vitro* contra o agente causador da malária *Plasmodium falciparum* (KOHLENER et al., 2002), antidiarreico e contra a disenteria (BATUGAL et al., 2004), antimicrobiana e antifúngica (ALI et al., 2001; GRAHAM et al., 2003; NAVEEN PRASAD et al., 2008; AZHAR et al., 2009; UKOHA et al., 2011). Estas propriedades foram atribuídas à presença de terpenos (KOHLENER et al., 2002), à presença de saponinas (VARSHNEY e VYAS, 1985) e de taninos (UKOHA et al., 2011).

McSweeney et al. (2001), ao estudarem os efeitos da leguminosa *Calliandra calothyrsus* sobre a síntese e diversidade microbiana no rúmen, concluíram que esta fonte de alimento causou alterações significativas na população microbiana, sem afetar a eficiência de síntese de proteína ruminal.

Krause et al. (2004), avaliando os efeitos de *Acacia angustissima*, também uma leguminosa, sobre a diversidade microbiana no rúmen de ovinos, observaram que as populações fibrolíticas de *Fibrobacter* e *Ruminococcus* aumentaram com a utilização de acácia na dieta. As cepas de *Selenomonas* tenderam a ser resistentes ao tanino presente nesta leguminosa e

Butyrivibrio fibrisolvens foi sensível. Por outro lado, cepas de *Streptococcus bovis* foram sensíveis, enquanto *Streptococcus gallolyticus* foi resistente.

O metabolismo microbiano pode ser explorado para assegurar que os nutrientes dos alimentos sejam utilizados eficientemente pelo animal e/ou que as substâncias tóxicas sejam eliminadas e/ou seus efeitos sobre o animal, reduzidos. Para tanto, existe a necessidade de um diagnóstico para monitorar a adequação da nutrição para otimizar a eficiência da utilização de nitrogênio e carboidratos pelo animal.

2.1 Potencialidades do uso de extratos vegetais como aditivos no arraçamento de ruminantes

A União Europeia aboliu a utilização de todos os antibióticos empregados na alimentação animal como fatores de crescimento, essa atitude estimulou a pesquisa por outros agentes antimicrobianos que pudessem afetar a fermentação ruminal.

Os extratos de plantas obtidos por métodos de vaporização e solventes orgânicos contêm um grupo de substâncias aromáticas denominadas “óleos essenciais” (a exemplo do eugenol e limoneno). Os óleos essenciais apresentam atividade antimicrobiana e são fornecidos para aves, suínos e ruminantes como uma alternativa aos antibióticos (RUSSELL, 2002).

Quando culturas mistas de bactérias do rúmen e bactérias que fermentam exclusivamente aminoácidos (hiper-produtoras de amônia) foram tratadas com óleos essenciais, a produção de amônia diminuiu. Óleos essenciais também reduziram a habilidade de *Ruminobacter amylophilus* colonizar alimentos e degradar proteínas. No entanto, experimentos adicionais serão necessários para avaliar se efeitos similares poderão ser demonstrados *in vivo* (RUSSELL, 2002).

Além disso, as plantas produzem metabólitos secundários que, muitas vezes, servem como mecanismos de defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros. Estes compostos são classificados em categorias de acordo com sua estrutura e propriedades químicas: fenóis e ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos, alcaloides, polipeptídeos, terpenoides. Estes metabólitos têm demonstrado atividade antimicrobiana *in vitro* e pesquisas vêm sendo realizadas na Medicina Humana e Veterinária para comprovar sua eficácia *in vivo* (COWAN, 1999).

Para modificar a fermentação ruminal, os compostos secundários de plantas compõem em possibilidades naturais. Saponinas e taninos, por exemplo, presentes em algumas plantas tropicais podem atuar nesse processo. Entretanto, quando fornecidos em altos níveis, esses compostos podem ter efeitos adversos na população microbiana ruminal e na saúde animal, enquanto em baixos níveis apresentam potencial para melhorar a fermentação ruminal. Esses compostos podem ser fornecidos aos animais diretamente pelo alimento ou por extratos retirados industrialmente desses alimentos e adicionados à dieta dos animais.

A presença de baixos níveis de taninos na dieta pode ser usada como potencial modulador da fermentação ruminal. Geralmente, a síntese de proteína microbiana é elevada na presença de taninos (MAKKAR, 2003). Um decréscimo na taxa de digestão ruminal, acarretada pelos taninos, pode contribuir para uma melhor sincronização da liberação dos nutrientes e, conseqüente aumento na eficiência da síntese de proteína microbiana (GETACHEW et al., 2000). Além disso, a presença de taninos favorece uma redução na produção de gases, podendo ser uma ferramenta para diminuir a incidência de timpanismo (KAHN e DÍAZ-HERNANDEZ, 2000) e, ainda, na capacidade de reduzir a produção de metano (WOODWARD et al., 2001), além da ação anti-helmíntica no trato gastrointestinal de ovinos contaminados por nematoides (ATHANASIADOU et al., 2000).

Cardoso et al. (2005) testaram a fermentação microbiana *in vitro* em pH 7,0 e 5,5 de seis extratos de plantas naturais e três metabólitos secundários vegetais em cinco doses (0; 0,3; 3; 30 e 300 mg/L) em líquido ruminal de novilhas alimentadas com dietas de alto concentrado. Os efeitos dos extratos e metabólitos foram pH-dependente. Em pH 5,5, a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta não alterou ou aumentou e a relação acetato:propionato diminuiu, o que não ocorreu quando o pH do meio foi 7,0.

Devant et al. (2007) avaliaram uma mistura de extratos de plantas no desempenho e fermentação ruminal de touros da raça Holandesa, alimentados com dietas de terminação de alto concentrado. Tanto a suplementação com monensina como com extratos de plantas não afetou o consumo e a eficiência alimentar. Aos 63 dias de experimento, o pH ruminal foi menor para os tratamentos monensina (6,08) e extrato de plantas (6,12), quando comparado ao grupo controle (6,52). A suplementação com monensina e com extrato de plantas aumentou a proporção molar de propionato, quando comparados ao controle.

A manipulação da fermentação ruminal tem como principais objetivos aumentar a formação de ácido propiônico, diminuir a formação de metano (responsável pela perda de 2% a 12% da energia do alimento) e reduzir a proteólise e deaminação da proteína alimentar no rúmen. Alguns aditivos podem alcançar parte desses efeitos, aumentando a eficiência produtiva.

2.2 Microbiota gastrointestinal de animais: limitações, técnicas moleculares de identificação e estudo de microrganismos de comunidades complexas

Sabe-se que as técnicas convencionais de cultivo não são aceitáveis para avaliar todos os membros de uma comunidade microbiana natural, além disso, são laboriosas e consomem tempo. O estudo da ecologia ruminal tem sido confusa, porque os meios seletivos não são eficazes para a maioria dos microrganismos anaeróbios (VAUGHAN et al., 2000; KAMRA, 2005) ou requerem isolamento individual, análises dos produtos finais de fermentação em

culturas puras, e também pelo lento crescimento, a identificação de um simples microrganismo pode levar semanas (VAUGHAN et al., 2000; RUSSELL e RYCHLIK, 2001). Também pelo fato da maioria das bactérias serem Gram-variáveis e apresentarem morfologias semelhantes, o que torna difícil uma rápida identificação (RUSSELL e RYCHLIK, 2001). O sucesso do cultivo em laboratório se deve, particularmente, por aqueles microrganismos dominantes ou especializados. Como consequência, os estudos de dinâmica da microflora são limitados por se tratar de uma comunidade microbiana complexa.

Entende-se por comunidades microbianas complexas ao conjunto de populações de micróbios que interagem entre si e com o ambiente no qual está inserido. Mudanças em fatores como pH, temperatura, salinidade, pressão osmótica, presença ou ausência de oxigênio, e variações nos subprodutos do metabolismo dos microrganismos presentes no meio são alguns dos elementos que podem causar sucessões microbiológicas nesses ambientes, ou matar completamente a comunidade (FRANK e PACE, 2008).

As relações de interdependência estabelecida entre os elementos supracitados e os microrganismos fazem com que estes sejam de difícil identificação, pois os meios seletivos tradicionais não são capazes de mimetizar as condições que microrganismos particulares requerem para sua proliferação em seu ambiente natural. A grande parte de bactérias em amostras ambientais não pode ser detectada através da microscopia convencional, pois elas aderem-se às partículas de solo e sedimentos tornando-se invisíveis (PACE, 1997; FRANK e PACE, 2008). Portanto, a compreensão da diversidade microbiana de comunidades complexas é bastante limitada. Segundo Amann et al. (1995), cerca de 95 a 99% dos microrganismos presentes em comunidades complexas são de difícil cultivo em laboratório, restringindo, assim, o conhecimento sobre sua biologia, por conseguinte, a maior proporção dos microrganismos ruminais é não-cultivável, mas é ativo no processo fermentativo no rúmen (KAMRA, 2005; MCSWEENEY et al., 2009).

Como alternativa para solucionar esse problema, técnicas da biologia molecular, como extração do DNA total da comunidade, PCR, DGGE e sequenciamento, surgem como mecanismos eficazes na identificação e estudos desses microrganismos (MAED et al., 1991).

Os métodos moleculares apresentam vantagens em relação aos métodos tradicionais de cultivo, pois são altamente específicos para detectar um gene ou sequências de ácidos nucleicos de um organismo particular, ou de um grupo de organismos; são usados para detectar e identificar organismos sem a necessidade de cultivo e isolamento em cultura pura, descartando a subjetividade dos testes microbiológicos; são muito sensíveis, permitindo a identificação de um maior número de microrganismos; são usados para detectar organismos específicos ou grupos taxonômicos amplificados, como é o caso de provas de regiões alvo da molécula de RNA ribossômico (rRNA) com diferentes níveis de variabilidade; e em geral, o genoma bacteriano é altamente estável e não é afetado pelas condições de crescimento (COUTINHO et al., 1999).

Os ácidos nucleicos (DNA e/ou RNA) constituem o material biológico através do qual são realizadas análises filogenéticas (taxonômicas), tipagens de espécies/linhagens e análise da diversidade de organismos em amostras complexas. No entanto, para que tais análises possam ser realizadas, os ácidos nucleicos precisam ser isolados dos outros constituintes celulares, e ressuspensos em solução aquosa. Muitas vezes, essas suspensões necessitam ainda passar por processo de purificação para que contaminantes, como proteínas e polissacarídeos, sejam retirados da solução. Essa descontaminação se faz necessária quando os contaminantes interferem em reações posteriores, como ampliações por PCR, hibridizações, digestões com enzimas de restrição e outras (TSAI e OLSON, 1992; AABO et al., 1993; VAUGHAN et al., 2000; ROOSE-AMSALEG et al., 2001).

Vários protocolos de isolamento de ácidos nucleicos estão descritos na literatura, porém, nenhum método é universalmente aplicável para o estudo de bactérias autóctones, pois cada tipo de amostra, devido à sua própria natureza, requer a otimização de um método de extração próprio (ZHOU et al., 1996). Esses protocolos são compostos por alguns poucos procedimentos básicos, necessários à desintegração e homogeneização de tecidos e células, à solubilização de ácidos nucleicos, à separação dos ácidos nucleicos dos outros constituintes celulares e à precipitação dos ácidos nucleicos. São protocolos que apresentam pequenas variações e podem ser mais ou menos convenientes a determinados propósitos em função do tempo gasto, da quantidade e pureza dos ácidos nucleicos obtidos, do nível de degradação dos ácidos nucleicos resultantes e da eficiência da lise das células-alvo (JACOBSEN, 1995; TSAI e OLSON, 1991).

Várias técnicas que envolvem a amplificação baseada em PCR de regiões dentro do gene de rRNA foram desenvolvidos especificamente para a análise da diversidade abundância de microrganismos no rúmen, incluindo protozoários, fungos, bactérias emetanogênicas. Estes métodos têm sido descritos e a sua aplicação é abrangente (MCSWEENEY et al., 2006; MACKIE et al., 2007).

O princípio básico da PCR está na capacidade de replicar exponencialmente uma determinada sequência de DNA, a partir de quantidades mínimas, de modo que esta se torne majoritária na amostra. O material inicial para análise, através da técnica de PCR, pode ser obtido a partir de diferentes amostras. Numa reação de PCR, o fragmento de DNA que desejamos multiplicar (ou amplificar) é chamado de fragmento alvo ou DNA molde. A capacidade de replicação está baseada na aptidão que os iniciadores específicos, que são pequenos fragmentos de DNA, têm em anelar somente com a sequência desejada através da complementariedade de bases para determinada região do DNA de um organismo. A *Taq* DNA polimerase (enzima responsável pela extensão do DNA alvo) distingue o complexo formado pelo iniciador e a fita do DNA molde, que resulta na cópia simultânea de ambos os sentidos do segmento do DNA entre os dois iniciadores anelados. Os passos de desnaturação, anelamento e

extensão acontecem de forma cíclica, graças à termoestabilidade da *Taq* DNA polimerase, até que a sequência alvo se encontre em quantidades detectáveis (OSTE, 1988; AABO et al., 1993; VAN DER ZEE e HUIS, 1997; KREUZER e MASSEY, 2002).

Quando são usados iniciadores específicos em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), fragmentos específicos no genoma do organismo são amplificados. É por este tipo de análise que podemos observar diferenças entre indivíduos. De acordo com o número de repetições das sequências que são observadas, ou seja, das bandas de diferentes tamanhos visualizadas em gel de agarose (ou poliacrilamida), podemos identificar o grau de parentesco ou até a origem da amostra em análise.

No entanto, a grande sensibilidade desta técnica apresenta também desvantagens, pois o risco de contaminação por uma molécula de DNA não presente na amostra de interesse se torna grande, sendo recomendado bastante cuidado em todos os estudos moleculares.

A fim de melhorar a caracterização e a análise de comunidades complexas, independentemente do cultivo das espécies que as compõem, tem sido focado o interesse no desenvolvimento de técnicas da biologia molecular, capazes de permitir o estudo da comunidade desses ambientes. A análise do gene 16S rRNA tem sido utilizada no estudo de microrganismos do ambiente (AMANN et al., 1995; EDWARDS et al., 2004; RODÍCIO e MENDOZA, 2004; SOKOL et al., 2006), porque este gene: está presente em todos os organismos; apresenta regiões conservadas, assim como regiões variadas, o que torna possível o desenho de iniciadores e sondas com diferentes níveis de especificidade; tem informações de sequências suficiente para inferência filogenética; e está presente em grande número nas células, o que facilita sua detecção (RODÍCIO e MENDOZA, 2004).

Diversas técnicas têm sido criadas para a análise do 16S rRNA (RODÍCIO e MENDOZA, 2004), dentre elas a mais utilizada é a técnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Esta técnica identifica diferenças estabelecidas no comportamento de desnaturação da dupla fita de DNA que, submetida a um gradiente crescente de concentração de agentes desnaturantes (ureia e formamida), se separam em fragmentos discretos, chamados de domínios de desnaturação, ou seja, *amplicons* de DNA com mesmo tamanho, mas com composição diferente, em pelo menos um par de bases, migrarão para posições diferentes no gel, gerando, assim, um perfil genotípico da comunidade (MUYZER et al., 1993).

O conhecimento sobre a diversidade microbiana dos diferentes ecossistemas do trato digestivo de algumas espécies é incompleto e fragmentado. Isso devido às limitações nas técnicas tradicionais de cultivo e microscopia. No entanto, técnicas moleculares como PCR e DGGE vêm complementando as informações acerca da diversidade microbiana de comunidades complexas.

A avaliação da composição e diversidade de populações microbianas complexas que habitam o trato gastrointestinal de ruminantes, especialmente no rúmen, tem sido dificultada pelo

vasto número de espécies residentes, e ainda correlacionando as repostas do hospedeiro aos fatores externos como a dieta (MCCRACKEN et al., 2001).

A DGGE tem sido utilizada na análise direta de DNA genômico de organismos com genomas de milhões de pares de bases, através da transferência de padrões de separação para membranas de hibridização, seguido por análise com sondas de DNA (MUYZER e SMALLA, 1998). Alternativamente, a PCR pode ser usada para amplificar seletivamente a sequência de interesse antes de a DGGE ser empregada. Estas sequências podem ser amplificadas a partir de um gene, ou parte deste, utilizando-se iniciadores gene-específico de microrganismos de interesse.

A DGGE é normalmente utilizada para determinar o número ou diferenças entre gêneros ou espécies de bactérias presentes na amostra. A nitidez dos padrões de bandas não é dependente somente do gradiente desnaturante proposto, mas também da qualidade de preparação do gel e das condições eletroforéticas (SIMPSON et al., 1999).

Vários são os trabalhos que validam a importância de tais técnicas moleculares para análise de diversidade, por exemplo, foi possível avaliação por meio da DGGE das comunidades complexas da microbiota do trato gastrointestinal em função das dietas fornecidas para diversos animais domésticos, como ruminantes (KOCHERGINSKAYA et al., 2001; FREITAS et al., 2008; SUN et al., 2008; CHENG et al., 2009; LODGE-IVEY et al., 2009; VINH et al., 2011) e selvagens com finalidades diversas (MACKIE et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009; SUNDSET et al., 2009;).

Argôlo (2007), estudando a diversidade microbiana do rúmen de cabras Saanen, em lactação, alimentadas com níveis crescentes de substituição do milho pelo farelo da vagem de algaroba no concentrado (0, 33, 67 e 100%), utilizaram a região variável V3 de 16S rDNA por ser uma região conservada de bactérias comumente encontradas no trato gastrintestinal. A região V3 do DNA total isolado do líquido ruminal de cabras leiteiras alimentadas com farelo da vagem de algaroba foi amplificada na PCR de todas as amostras analisadas, cuja amplificação resultou em produtos de aproximadamente 200 pb. Foi possível observar diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR para cabras lactantes que receberam dietas em que o milho foi substituído por farelo da vagem de algaroba, demonstrado pelo número e intensidades diferentes de bandas, e que, provavelmente, houve influência dos níveis do farelo da vagem de algaroba na dieta sobre a diversidade bacteriana ruminal, devido às mudanças observadas.

Estudos moleculares prévios sobre as mudanças na população ruminal tenderam sempre a focalizar nas alterações na composição da dieta (TAJIMA et al., 2001). Muitas características morfológicas, bioquímicas e genéticas têm sido utilizadas para identificar os constituintes de uma comunidade complexa de microrganismos. A sequência de 16S rDNA, que é diferente entre as diversas espécies bacterianas, tem sido empregada como um indicador de diversidade.

No entanto, utilização de técnicas moleculares é apenas uma ferramenta que pode fornecer informações para maiores análises das técnicas microbiológicas tradicionais e sobre aspectos nutricionais.

2.3 Técnica semiautomática *in vitro* de produção de gases

A produtividade dos ruminantes depende da adequada nutrição com respeito, principalmente, a composição e a qualidade nutricional dos alimentos fornecidos, que se reflete no consumo voluntário e na digestibilidade (GETACHEW et al., 2005). A avaliação da digestibilidade dos alimentos e suas potencialidades como nutrientes é importante não só para estimar com maior exatidão o desempenho animal e maximizar a eficiência de utilização dos nutrientes (FOX et al., 1992; RUSSELL et al., 1992; SNIFFEN et al., 1992), mas também para a conservação do ambiente, desde a excreção de alimentos não digeridos, bem como a emissão de gases, que afetam o ambiente (GETACHEW et al., 2005). Numa tentativa de aumentar a eficiência de utilização dos alimentos, o particionamento de substratos digeridos entre produtos úteis e resíduos é considerado importante na avaliação da forragem. Atualmente, há uma necessidade por alimentos que sejam altamente digeríveis e tenham uma alta proporção de nutrientes digeridos convertidos a produtos utilizáveis. Para completar a avaliação da qualidade de tais alimentos, é necessária uma ferramenta que produza resultados reflexivos da digestão em animais (GETACHEW et al., 2005).

Muitos métodos estimam a digestibilidade ou degradabilidade para prever o valor nutritivo dos alimentos, comumente utilizam-se ensaios *in vivo*, que são mais precisos, entretanto, requerem grandes quantidades de animais e alimentos, mão-de-obra, tempos e recursos financeiros, além de avaliar um número limitado de substratos, dificultando sua aplicabilidade (MAURICIO et al., 1999; MAURICIO et al., 2003; GETACHEW et al., 2005).

Uma alternativa que permita estimar a qualidade nutricional dos alimentos e que a demanda animal se restrinja a um único doador de inóculo é a técnica de produção de gases *in vitro*, que apresenta alta correlação entre o consumo e digestibilidade *in vivo*.

A técnica *in vitro* de produção de gases desenvolvida por Theodorou et al. (1994) caracteriza-se pela leitura manual do volume de gases produzidos através de uma seringa plástica graduada. O uso da seringa restringe o número de amostras analisadas por experimento, diminui o número de leituras e, conseqüentemente, compromete a descrição da curva de fermentação, principalmente, durante o período inicial de fermentação (*lag-phase*) e muitas vezes comprometem a acurácia das leituras devido a erros cometidos pelo operador.

A técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases (MAURICIO et al., 1999) apresenta comprovado potencial em descrever a cinética da fermentação no rúmen, fornecer a

taxa e a extensão da degradação das forrageiras (GETACHEW et al., 1998), bem como medir produtos da fermentação de partes solúveis e insolúveis de substratos (PELL e SCHOFIELD, 1993). Essa técnica permite avaliar grande número de substratos por experimento, apresentando alta exatidão nas medições, simplicidade no manuseio de equipamentos e baixo custo na implantação e por amostra analisada. A técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases (MAURICIO et al., 1999) utiliza um transdutor digital de pressão para mensuração dos gases produzidos em frascos de fermentação com ambientes anaeróbicos, acrescidos do substrato a ser testado, meio de cultura e inóculo microbiano ruminal. Através de uma equação desenvolvida especificamente para determinados laboratórios, transforma pressão em volume.

A técnica de produção de gases considera a conversão de todas as principais fontes, ricas de energia metabolizável, como pectinas, amido, celulose e hemicelulose, em CO₂ e metano. Assim, essa técnica pode ser utilizada tanto para determinar a importância de algumas dessas diferentes frações do alimento quanto para fornecer energia para os microrganismos (PELL e SCHOFIELD, 1993). Logo, a produção de gases é influenciada pela composição dos alimentos, de forma que a fermentação de alimentos ricos em fibra, celulose e hemicelulose resultam em maior produção de gases em relação àqueles ricos em amido, devido à diferente relação acetato:propionato entre estes substratos. A produção de propionato pode consumir H₂ do meio, diminuindo a produção de gases (PG) dentro dos frascos. Por outro lado, a produção de acetato gera excedentes de H₂, que são utilizados em associação com CO₂ para a produção de CH₄, aumentando a pressão interna dos frascos e, conseqüentemente, a produção de gases (RUSSELL, 2002). Ainda, em relação à digestão da fibra e ao crescimento microbiano, assume que a produção de massa celular bacteriana e de gases é proporcional à quantidade de substrato digerido (SCHOFIELD et al., 1994).

Segundo Nogueira et al. (2006), a avaliação de alimentos exclusivamente pela produção total de gases pode acarretar em erros, uma vez que alimentos potencialmente menos degradáveis, como forragens, podem ser considerados nutricionalmente superiores aos concentrados ou outros alimentos de maior degradabilidade. Por esta razão, tornar-se provada a importância da avaliação simultânea da degradabilidade da matéria seca (DMS) e da PG para a avaliação nutricional dos alimentos.

3 REFERÊNCIAS

- AABO, S.; RASMUSSEN, O.F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P.D.; OLSEN, J.E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Celular Probe**. v.07, p.171-178. 1993.
- AHMAD, A.; KHURSEED, A.K.; SABIHA, Q.; VIQARUDDIN, A. Antifungal activity of some hydrosoluble *Prosopis juliflora* alkaloids. **Fitoterapia**. v.60, n.1, p.86-89. 1989.
- ALI, M.S.; AZHAR, I.; AHMAD, F.; AHMAD, V.U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial screening of mimoaceous plants. **Pharmaceutical Biology**. v.39, n.1, p. 43-46. 2001.
- ALMEIDA; P.J.P.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, F.F.; SANTOS, A.B.; PEREIRA, T.C.J.; SANTOS, E.J.; MOREIRA, J.V. Santa Inês sheep supplementation on urochloa grass pasture during the dry season: intake, nutrient digestibility and performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.41, n.3, p.668-674. 2012.
- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**. v.59, n.1, p.143-169. 1995.
- ARGÔLO, L.S. **Microbiota ruminal de cabras lactantes alimentadas com algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.): análise funcional e molecular**. 2007. 106p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Itapetinga – BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- ARGÔLO, L.S.; PEREIRA, M.L.A.; DIAS, J.C.T.; CRUZ, J.F.; DEL REI, A.J.; OLIVEIRA, C.A.S. Farelo 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.
- ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R.L. Effects of shortterm exposure to condensed tannins on adult *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Record**. v.146, p.728–732.2000.
- AQEEL, A.; KHURSHEED, A.K.; VIQARUDDIN, A.; SABIHA, Q. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. **Arzneimittelforschung**. v.39, n.6, p.652-655. 1989.
- AZHAR, I.; MOHTASHEEMUL, H.; MAZHAR, F.; ALI, M.S. Some biological evaluations on *Samanea saman*. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.26, n.1, p.47-53. 2009.
- BABAYEMI, O.J.; BAMIKOLE, M.A. Effects of *Tephrosia cândida* DC leaf and its mixtures with Guinea grass on *in vitro* fermentation changes as feed ruminants in Nigeria. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.5, p. 14-18. 2006.
- BABAYEMI, O.J.; AJAYI, F.T.; TAIWO, A.A.; BAMIKOLE, M.A.; FAJIMI, A.K. Performance of West african dwarf goat fed *Panicum maximum* and concentrate diets supplemented with lablab (*Lablab purpureus*), leucaena (*Leucaena leucocephala*) and gliricidia (*Gliricidia sepium*) foliage. **Nigerian Journal of Animal Production**. v.33, p.102-111. 2006.

- BABAYEMI, O.J.; INYANG, U.A.; IFUT, O.J.; ISAAC, L.J. Nutritional value of cassava wastes ensiled with *Albizia saman* pod as feed for ruminants in off season. **Agricultural Journal**. v.5, n.3, p.220-224. 2010.
- BATISTA, A.M.; MUSTAFA, A.F.; MCKINNON, J.J.; KERMASHA, S. In situ ruminal and intestinal nutrient digestibilities of mesquite (*Prosopis juliflora*) pods. **Animal Feed Science and Technology**. v.100, p.107-112. 2002.
- BATUGAL, P.A.; KANNIAH, J.; YOUNG, L.S.; OLIVER, J.T. (eds.). **Medicinal Plants Research in Asia**, Volume 1: The Framework and Project Workplans. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia. 228p. 2004.
- BHATTA, R.; VAITHIYANATHAN, S.; SINGH, N.P.; VERMA, D.L. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. **Small Ruminant Research**. v.67, p. 75-83. 2007.
- CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FERRET, A.; KAMEL, C. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. **Journal Animal Science**.v.83, n.11, p.2572-2579, 2005.
- COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological inovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v.71, n.3, p.491-503. 1999.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**.v.12, p.564-582. 1999.
- CHENG, Y.F.; MAO, S.Y.; LIU, J.X.; ZHU, W.Y. Molecular diversity analysis of rumen methanogenic Archaea from goat in eastern China by DGGE methods using different primer pairs. **Letters in Applied Microbiology**. v.48, p.585–592. 2009.
- CHOUDHARY, M.I.; NAWAY, S.A.; ZAHEER-UL-IIAQ, A.; 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 Communication**. v.332, n.4, p.1171-1179. 2005.
- COOK, R.W.; SCOTT, C.B.; HARTMANN, F.S. Short-term mesquite pod consumption by goats does not induce toxicity. **Rangeland Ecology & Management**. v.61, n.5, p.566-570. 2008.
- DALY, K.; STEWART, C. S.; FLINT,H. J.; SHIRAZI-BEECHEY, S.P. Bacterial diversity within equine large intestine as revealed by molecular analysis of cloned 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**. v.38. p.141-151. 2001.
- DEVANT, M.; ANGLADA, A.; BACH, A. Effect of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**. v.137, n.1-2, p.46-57, 2007.
- EDWARDS, J.E.; MCEWAN, N.R.; TRAVIS, A.J.; WALLACE. R.J. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.86, p.263-281. 2004.

- FOX, D.G.; SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; RUSSEL, J.B.; VAN SOEST, P.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: III. Cattle requirements and diet adequacy. **Journal Animal Science**. v.70, n.11, p.3578-3596. 1992.
- FRANK, D.N.; PACE, N.R. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. **Current Opinion in Gastroenterology**. v.24, p.4-10. 2008.
- FREITAS, K.C.; GABRIEL, J.E.; LEITE, L.C.; ARMAS, R.D.; LANNA, D.P.D.; MADEIRA, H.M.F. Molecular characterization of ruminal bacterial diversity *in vitro*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v.30, n.2, p.187-192. 2008.
- GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutrition quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**. v.72, p.261-281. 1998.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Tannins in tropical browses: effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.48, p.3581-3588. 2000.
- GETACHEW, G.; DEPETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; FADEL, J.G. Use of an *in vitro* ruman gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**. v.123-124, p.547-559. 2005.
- GRAHAM, J.G.; PENDLAND, S.L.; PRAUSE, J.L.; DANZINGER, L.H.; SCHUNKE VIGO, J.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N.R. Antimycobacterial evaluation of peruvian plants. **Phytomedicine**. v.10, n.6-7, p.528-535. 2003.
- 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.
- JACOBSEN, C.S. Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n.9, p. 3347-3352. 1995.
- KAHN, L.P.; DIAZ-HERNANDEZ, A. Tannins with anthelmintic properties. *In: BROOKER, J.D. (ed.), Tannins in Livestock and Human Nutrition*. ACIAR Proceedings. n. 92, pp. 130-139. 2000.
- KAITHO, R.J.; UMUNNA, N.N.; NSAHLAI, I.V.; TAMMINGA, S.; VAN BRUCHEM, J. Nitrogen in browse species: ruminal degradability and post-ruminal digestibility measured by mobile nylon bag and *in vitro* techniques. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.76, p.488-498. 1998.
- KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**. v.89, n.1, p.124-135. 2005.
- KAUSHIK, J.C.; SANJAY, A.; TRIPATHI, N.N. Antifungal properties of some plant extracts against the damping-off fungi of forest nurseries. **Indian Journal For**. v.25, n.3 e 4, p.359-361. 2002.

- KOCHERGINSKAYA, S.A.; AMINOV, R.I.; WHITE, B.A. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. **Anaerobe**. v.7, p.119–134. 2001.
- KOHLER, I.; JENETT-SIEMSA, K.; SIEMSB, K.; HERNA'NDEZC, M.A.; IBARRAC, R.A.; BERENDSOHND, W.G.; BIENZLEE, U.; EICHA, E. *In vitro* antiplasmodial investigation of medicinal plants from El Salvador. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**. v.57c, p.277-281. 2002.
- KRAUSE, D.O.; DALRYMPLE, B.P.; SMITH, W.J.M.; MACKIE, R.I.; MCSWEENEY, C.S. 16SDNA sequencing of *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*: design of a signature probe and its application in adult sheep. **Microbiology**. v.145. p.1797-1807. 1999.
- KRAUSE, D.O.; SMITH, W.J.M.; MCSWEENEY, C.S. Use of community genome (CGAs) to assess the effects of *Acacia angustissima* on rumen ecology. **Microbiology**. v.150, p.2899-2909. 2004.
- KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434p.
- LODGE-IVEY, S.L.; BROWNE-SILVA, J.; HORVATH, M.B. Technical note: Bacterial diversity and fermentation endproducts in rumen fluid samples collected via oral lavage or rumen cannula. **Journal of Animal Science**. v.87, p.2333-2337. 2009.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 352 p. 1998.
- MAED, D.A.; PEY, N.K.; HERRNSTADT, C.; MARCIL, R.A.; SMITH, L.M. A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. **BioTechnology**. v.9, p. 657-661. 1991.
- MACKIE, R.I.; CANN, I.K.O.; ZOETENDAL, E.G. et al. Molecular approaches to study bacterial diversity and function in the intestinal tract. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE NUTRITION OF HERBIVORES, 7., 2007, Beijing. **Proceedings...** Beijing: China Agricultural University Press, 2007. p.75-107.
- MAHGOUB, O.; KADIM, I. T.; JOHNSON, E. H.; SRIKANDAKUMAR, A.; AL-SAQRI, N.M.; AL-ABRI, A.S.; RITCHIE, A. The use of a concentrate containing Meskit (*Prosopis juliflora*) pods and date palm by-products to replace commercial concentrate in diets of Omani sheep. **Animal Feed Science and Technology**. v.120, p.33-41. 2005a.
- MAHGOUB, O.; KADIM, I. T.; FORSBERG, N. E.; AL-AJMI, D.S.; AL-SAQRY, N.M.; AL-ABRI, A.S.; ANNAMALAI, K. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats. **Animal Feed Science and Technology**. v.121, p.319-327. 2005b.
- MAKKAR, H. P. S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**. n. 49, p. 241–256. 2003.
- 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 Thecnology**. v.79, p.321-330. 1999.
- MAURICIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M.; MARTINS, R.G.R.; RODRIGUES, J.A.S. Potencial da Técnica *in Vitro* Semi-Automática de Produção

- de Gases para Avaliação de Silagens de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.32, n.4, p.1013-1020. 2003.
- 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 Herb Pharmacother**. v.3, n.2, p.31-37. 2003.
- MCCRACKEN, V.J.; SIMPSON, J.M.; MACKIE, R.I.; GASKINS, H.R. Molecular ecology analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. **Journal of Nutrition**. v.131, n.6, p.1862-1870. 2001.
- MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D.O. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**. v.90, p.78-88. 2001.
- MCSWEENEY, C.S.; DENMAN, S.E.; WRIGHT, A.-D.G.; YU, Z. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. AAAP Conference, Korea. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**.v.20, p.283-294. 2006.
- MCSWEENEY, C.; KANG, K.; GAGEN, E.; DAVIS, D.; MORRISON, M.; DENMAN, S. Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, p.341-351. 2009 (supl. especial).
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.3, p.695-700. 1993.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**. v.73, p.127-141. 1998.
- 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, p.587-591. 2004a.
- NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.). **Plant Growth Regulation**. v.44, p.207-210.2004b.
- NAVEEN PRASAD, R.; VISWANATHAN, S.; RENUKA DEVI, J.; VIJAYASHREE NAYAK; SWETHA, V.C.; ARCHANA, B.R.; PARATHASARATHY,N.; RAJKUMAR, J. Preliminary phytochemical screening antimicrobial activity of *Samanea saman*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.2, n.10, p.268-270. 2008.
- NOGUEIRA, U.T.; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C.; PEREIRA, L.G.R. Predição da degradação da matéria seca pelo volume de gases utilizando a técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, n. 5, 2006.
- OLIVEIRA, E.G.; SANTOS, A.C.F.; DIAS, J.C.T.; REZENDE, R.P.; NOGUEIRA-FILHO, S.L.G.; GROSS, E. The influence of urea feeding on the bacterial and archaeal community in the forestomach of collared peccary (*Artiodactyla*, *Tayassuidae*). **Journal of Applied Microbiology**. v.107, n.5, p.1711–1718. 2009.

- OSTE, C. Product application focus: polymerase chain reaction. **BioTechniques**. v.6, n.2, p.162-167. 1988.
- PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**.v.276, n.2, p.734-740. 1997.
- PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. **Atuações zootécnicas para adequação ambiental na bovinocultura**. ZOOTEC, João Pessoa, PB. 2008.
- PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computadorized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **Journal of Dairy Science**. v.76, p.1063-1073. 1993.
- PIRES, I.E. Caracterização da base genética de uma população de Algaroba – *Prosopis juliflora* (SW) DC – existente na região de Soledade – PB. **IPEF**. n.30, p.29-36. 1985.
- QUINTANS, F. de A. **Algaroba: uma esperança para a pecuária no semi-árido nordestino**. 31 de janeiro de 2001. Disponível em: <<<http://caprinet.com.br>>>. Acesso em: Mar 2004.
- RODÍCIO, M.R.; MENDOZA, M.C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones em microbiología clínica. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**.v.22, n.4, p.238-45. 2004.
- ROOSE-AMSALEG, C.L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil an sediment samples. **Applied Soil Ecology**. v. 18, p. 47-60. 2001.
- RUSSEL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G. et al. A net carbohydrat and Protein System for evaluation cattle diets. I. Ruminant fermentation. **Journal of Animal Science**.v.70, n.11, p.3351-3561. 1992.
- RUSSELL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**. v.292, p.1119-1122. 2001.
- RUSSELL, J.B. **Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition**. James B. Russell, Ithaca, NY. 2002.
- 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.
- SAWAL, R.K.; RATAN, R.; YADAV, S.B.S. Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource livestock – A Review. **Asian-Australasian Journal Animal Science**. v.17, n.5, p.719-725. 2004.
- SCHULTZE-KRAFT, R.; t' MANNETJE, L. Evaluation of species and cultivars. *In: t' MANNETJE e JONES* (2000). **Field and Laboratory Methods for Grassland and Animal Production Research**. CABI Publishing, 2000. p. 179-204.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**.v.72, n.11, p. 2980-2991. 1994.
- SILVA, S.A.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; ALENCAR, A.L.S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J.M.O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**. v.24, n.4, p.460-464. 2001.

- SIMPSON, J.M.; MCCRACKEN, V.J.; WHITE, B.A.; GASKINS, H.R.; MACKIE, R.I.; Application of denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. **Journal of Microbiological Methods**. v.36, p.167-179. 1999.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. v.70, n.11, p.3562-3577. 1992.
- SOKOL, H.; LEPAGE, P.; SEKSIK, P.; DORÉ, J.; MARTEAU, P. Temperature gradient gel electrophoresis of fecal 16S rRNA reveals active *Escherichiacoli* in the microbiota of patients with ulcerative colitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.44, n.9, p.3172-3177. 2006.
- SOUZA, A.A.; ESPÍNDOLA, G.B. Bancos de proteína de leucena e guandu para suplementação de ovinos em pastagem de capim-bufel. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. (CD ROM). 2000.
- SUNDSET, M.A.; EDWARDS, J.E.; CHENG, Y.F.; SENOSIAIN, R.S.; FRAILE, M.N.; NORTHWOOD, K.S.; PRÆSTENG, K.E.; GLAD, T.; MATHIESEN, S.D.; WRIGHT, A.D.G. Rumen microbial diversity in Svalbard reindeer, with particular emphasis on methanogenic archaea. **FEMS Microbiology Ecology**. v.70, p.553-562. 2009.
- SUN, Y.Z.; MAO, S.Y.; YAO, W.; ZHU, W.Y. DGGE and 16S rDNA analysis reveals a highly diverse and rapidly colonising bacterial community on different substrates in the rumen of goats. **Animal**. v.2, n.3, p.391-398. 2008.
- TABOSA, I.M.; SOUZA, J.C.; GRAÇA, D.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N.; RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigeminal nuclei in goats caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods. **Veterinary and Human Toxicology**. v.42, n.3, p.155-158. 2000.
- TAJIMA, K.; AMINOV, R. I.; NAGAMINE, T.; OGATA, K.; NAKAMURA, M.; MATSUI, H.; BENNO, Y. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology**. v.29, p.159-169. 1999.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B. A simple gas production method using a pressure transducer to determine fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**. v.48, p.185-197. 1994.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 11, p. 4210-4215, 1996.
- TIMMERMANS Jr., S. J.; JOHNSON, L. M.; HARRISON, J. H. Estimation of the flow of microbial nitrogen using milk uric acid or allantoin. **Journal of Dairy Science**. v.83, p.1286-1299. 2000.
- TSAI, Y.; OLSON, B.H. Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2292-2295. 1992.

- UKOHA, P.O.; CEMALUK, E.A.C.; NNAMDI, O.L.; MADUS, E.P. Tannins and other phytochemical of the *Samanea saman* pods and their antimicrobial activities. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. v.5, n.8, p.237-244. 2011.
- VAN DER ZEE, H.; HUIS, J.H.J. Rapid and alternative screening methods for microbiological analysis. **Journal of AOAC International**.v.80, p.934-940. 1997.
- VARSHNEY, I.P.; VYAS, P. Samanin-C and samanin-E new saponins from *Pithecolobium saman*. **Fitoterapia**. v.56, p.281-283. 1985.
- VAUGHAN, E.E.; SCHUT, F.; HEILIG, H.G.H.J.; ZOETENDAL, E.G.; de VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L.A molecular view of the intestinal ecosystem. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. v.1, n.1, p.1-12. 2000.
- VINH, N.T.; WANAPAT, M.; KHEJORNART, P.; KONGMUM, P. Studies of diversity of rumen microorganisms and fermentation in swamp buffalo fed diferente diets. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v.10, n.4, p.406-414. 2011.
- WOODWARD, S.L.; WAGHORN, G.C.; ULYATT, M.J.; LASSEY, K.R. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emissions from ruminants. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, (NZSOAP'01), New Zealand Society of Animal Production, pp: 23-26.2001.
- YOKOYAMA, M.T.; JOHNSON, K.A. *In: El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición*. p.137. CHURCH, D.C. ed. Zaragoza: Acribia. 1993.
- ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M.; FERREIRA, D.J.; ALMEIDA J.C.C.; MACEDO JÚNIOR, G.L.; OLIVEIRA, J.S. Composição bromatológica de leguminosas do semi-árido brasileiro. **Livestock Research for Rural Development**. v.17, n.8. 2005.
- ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and Environmental Microbiology**. v.62, n.2, p.316-322. 1996.

CAPÍTULO 1

EXPERIMENTO PILOTO: Fermentação *in vitro* com Extratos

**Fermentação *in vitro* por Microbiota Ruminal de Bovinos
com Níveis de Extratos Etanólicos obtidos de
Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais**

***In Vitro* Fermentation of Cattle Ruminal Microbes with Levels of
Ethanol Extracts Obtained from the Brans Pods Tropical Legumes**

RESUMO

ARGÔLO, L.S. **Fermentação *in vitro* por Microbiota Ruminal de Bovinos com Níveis de Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Tese - Doutorado em Zootecnia - Produção de Ruminantes).*

A utilização de extratos vegetais como aditivos tem sido difundido como possíveis modificadores da fermentação ruminal. O objetivo do trabalho foi avaliar o potencial dos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e de *Samanea tubulosa* como aditivo natural, visando à redução de perda de energia e/ou proteína do sistema ruminal e estabelecer uma concentração mais adequada para estudos posteriores. Os extratos etanólicos foram obtidos por percolação com etanol a partir dos farelos das leguminosas arbóreas tropicais. As análises *in vitro* consistiram no efeito desses extratos sobre o metabolismo da microbiota ruminal de vacas da raça Holandesa. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão à significância de 5% de probabilidade. As equações de regressão para a degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS) em função da produção de gases (PG) apresentou efeito quadrático negativo para todos os tratamentos. A diversidade genética de arqueas foi determinada por meio da DGGE dos produtos de PCR da região 1100-1400 do 16S rDNA, obtidos de *primers* universais para procariotos. O protocolo desenvolvido incluiu a otimização de: procedimentos na extração do DNA, amplificação pela PCR e, otimização de preparação do gel de DGGE. Observaram-se variações nos padrões de bandas do gel, indicando alterações das populações estudadas em função dos tratamentos. Os extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* apresentaram potencial para mitigação de metano.

Palavras-chave: fermentação *in vitro*, metano, PCR-DGGE, *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa*.

*Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira, UESB e Co-orientadores: Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias, UESC, Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo, UESB e Prof. Dr. Ronan Batista, UESB.

ABSTRACT

ARGÔLO, L.S. **In Vitro Fermentation of Cattle Ruminal Microbes with Levels of Ethanol Extracts Obtained from the Brans Pods Tropical Legumes.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Thesis – Doctor Degree in Animal Science – Production of Ruminant).*

The use of plant extracts as additives have been disseminated as possible modifiers of rumen fermentation. The objective of this study was to evaluate the potential of ethanol extracts of *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* and *Samanea tubulosa* as natural additive, in order to reduce energy loss and/or protein system ruminal and establish a suitable concentration for further studies. The ethanol extracts were obtained by percolation with ethanol from the crumbs of tropical legume trees. The analysis consisted in vitro effect of these extracts on ruminal microbial metabolism of Holstein cows. The experimental design was completely randomized. Data were subjected to analysis of variance and regression significance level of 5% probability. The regression equations for the true degradability of dry matter (TDDM) as a function of gas production (GP) showed negative quadratic effect for all treatments. The genetic diversity of archaea was determined by DGGE of PCR products in the region 1100-1400 of the 16S rDNA obtained from universal primers for prokaryotes. The protocol developed included optimization: procedures in DNA extraction, PCR amplification and optimization of DGGE gel preparation. A variation in band patterns of the gel, indicating changes in the populations studied as a function of treatments. The ethanol extracts of *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* and *Samanea tubulosa* showed potential for mitigation of methane.

Keywords: degradation rate, in vitro fermentation, methane, PCR-DGGE, *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa*.

* Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, *D. Sc.*, UESB and Co-advisers: João Carlos Teixeira Dias, *D. Sc.*, UESC, Mauro Pereira de Figueiredo *D. Sc.*, UESB and Ronan Batista, *PhD.*, UESB

1 INTRODUÇÃO

O uso de leguminosas como fonte de nutrientes durante a estação seca tem resultado em aumentos de produção animal, como ganhos de peso e produção de leite nos animais avaliados (SILVA, 1981; NOBRE, 1981; OLIVEIRA, 2009; ALMEIDA et al. 2012), estimulando sua utilização, principalmente as espécies perenes e nativas. Algumas leguminosas são utilizadas como fonte alternativa de alimento por animais e populações pobres em muitas regiões áridas e semiáridas do mundo, no entanto, a utilização dessas leguminosas torna-se limitada devido a pouca informação dos seus valores nutricionais.

A diversidade de leguminosas tropicais aptas a serem usadas como forrageiras é muito maior do que de leguminosas temperadas, no entanto, o seu uso ainda é restrito, comparado com essas últimas. A procura dos rebanhos por leguminosas nativas ou adaptadas às áreas secas do Nordeste Brasileiro e ainda a grande produção de vagens por parte dessas leguminosas tem incitado sua utilização como potenciais ingredientes de suplementos e desenvolvimento de aditivos naturais para rações de ruminantes, além disso, movimentando economicamente a pecuária na região e, ainda, estimulando a utilização e a conservação dos recursos ambientais disponíveis.

Pesquisas desenvolvidas com ovinos e caprinos (BUZO et al., 1972; MAHGOUB et al., 2005a; MAHGOUB et al., 2005b; ARGÔLO et al., 2010) alimentados com farelo da vagem de algaroba (*Prosopis juliflora*) têm confirmado estas expectativas de exploração de espécies leguminosas com potencial forrageiro. Este é o caso dos gêneros *Prosopis* e *Samanea*, plantas forrageiras produtoras de alimento de alto valor energético, com teor proteico que supera as gramíneas, e que apresentam boa digestibilidade e palatabilidade (LORENZI, 1998; BATISTA et al., 2002).

Estas plantas contém, frequentemente, metabólitos secundários bioativos e antimicrobianos, entre eles saponinas, taninos, alcaloides e lectinas (AHMAD et al., 1989; AQEEL et al., 1989; KAITHO et al., 1998; SATISH et al., 1999; ALI et al., 2001; KAUSHIK et al., 2002; GRAHAM et al., 2003; BATUGAL et al., 2004; BHATTA et al., 2007; NAVEEN PRASAD et al., 2008; AZHAR et al., 2009; UKOHA et al., 2011), que são uma limitação importante do ponto de vista nutricional (KAITHO et al., 1998), mas também representam um potencial em termos de mitigação de metano (CH₄) (CARULLA et al., 2005; HU et al., 2006; SOLIVA et al., 2008). Como vários metabólitos secundários têm demonstrado atividade antimicrobiana, já se tem sugerido utilizá-los como aditivos alternativos na alimentação animal (GREATHEAD, 2003), pelo fato de serem possíveis modificadores da fermentação ruminal, aumentando a eficiência de utilização da energia dos alimentos e reduzindo as emissões de gases (GARCIA-GONZÁLEZ et al., 2006).

Os ruminantes são os maiores responsáveis pela formação biogênica de metano. São estimadas que 80 milhões de toneladas das emissões globais de metano, produzidas por ano, são oriundas de processos entéricos (US EPA, 2000). As emissões entéricas de CH₄ surgem da fermentação do alimento no rúmen e intestino grosso. As emissões de CH₄ representam uma perda significativa de energia da dieta que poderiam ser redirecionados para a produção de leite e carne (ECKARD et al. 2010) e depende, por exemplo, do tipo da dieta, nível de alimentação, e características dos ruminantes como tamanho, idade e espécie (ABDALLA et al., 2012).

Uma grande diversidade de microrganismos está envolvida no processo fermentativo que produz H₂ e CO₂, que, por sua vez, são utilizados como substrato para a formação de CH₄, reduzindo o hidrogênio do meio e tornando o ambiente mais adequado para o ecossistema microbiano do rúmen. Apesar deste efeito benéfico, a produção de CH₄ é um processo de desperdício energético (ANDERSON et al., 2003) e sua emissão pelos ruminantes tem recebido considerável atenção devido a sua contribuição para o aquecimento global (LASSEY, 2007). Portanto, estratégias que visam à redução na emissão de gases que interferem sobre o efeito estufa e melhore a eficiência da produção dos ruminantes são de fundamental importância para a produção animal.

O controle na emissão de CH₄ pode ser realizada por meio de intervenção ruminal direta (JOBLIN, 1999), porque o CH₄ é produzido por arqueas metanogênicas, que é um grupo distinto de microrganismos que compõe, normalmente, o ecossistema microbiano do rúmen (TAVENDALE et al., 2005). O H₂ e CO₂ são os substratos para as metanogênicas ruminais, logo a utilização de compostos que inibem a atividade de metanogênicas susceptíveis reduzirá ou eliminará a produção de CH₄. Outras estratégias de manipulação da fermentação ruminal podem contribuir para a redução na produção desse gás, como composição da dieta, pode-se introduzir amido, pois é um promotor para a formação de propionato, interferindo na metanogênese (HOOK et al., 2010); utilização de fontes de lipídios; tratamentos de alimentos; utilização de aditivos alimentares, entre eles os ionóforos, a monensina é a mais amplamente utilizada no Brasil, ela seleciona microrganismos Gram negativos, causando modificações na produção de propionato, por esta razão, atribui-se que a monensina não afeta diretamente a produção de metano, mas inibe as metanogênicas, por impedir o crescimento de bactérias que provêm o substratos para metanogênese (RUSSELL e STROBEL, 1989; HOOK et al., 2009; HOOK et al., 2010); e utilização de aditivos fitogênicos que têm sido pesquisados quanto suas potencialidades como manipuladores da fermentação ruminal (BROUDISCOU et al., 2002; SLIWINSKI et al., 2002; GOEL et al., 2008; JAYANEGARA et al., 2010; SIHORI et al., 2012).

Diante da possibilidade de utilização de extratos etanólicos de farelos das vagens de *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C., de *Samanea saman* e de *Samanea tubulosa* (Benth.), Barneby & Grimes como modificadores da fermentação ruminal, o objetivo deste trabalho foi avaliar o

potencial dos extratos etanólicos dessas leguminosas como aditivo natural, visando a redução de perda de energia e/ou proteína do sistema ruminal e estabelecer uma concentração mais adequada para estudos posteriores.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação do Extrato Etanólico Bruto

As vagens de *Samanea saman* (Anexo B) e *Samanea tubulosa* (Anexo C) foram adquiridas no município de Itapetinga-Bahia-Brasil e as vagens de *Prosopis juliflora* (Anexo A) foram obtidas no município de Brumado-Bahia-Brasil. Uma exsicata de cada material encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia-Brasil.

Os farelos de vagens das leguminosas foram produzidos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-Bahia-Brasil. As vagens coletadas foram secas ao sol durante três dias. Em seguida, foram processadas em um triturador e moídas com peneira de 2 mm para obtenção do farelo. Após a moagem, as amostras, então, foram destinadas à estufa de ventilação forçada, por 72 horas, a $60 \pm 5^\circ\text{C}$, em seguida, foram trituradas novamente em moinho tipo facas, com peneira de malha de 1 mm, e, finalmente, acondicionadas individualmente em recipientes plásticos, para posteriores análises. As composições químicas dos farelos utilizados para a obtenção dos extratos etanólicos, bem como do farelo de trigo, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química (% matéria seca) dos Farelos de Vagem de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa* e do farelo de trigo.

Item	<i>Prosopis Juliflora</i>	<i>Samanea saman</i>	<i>Samanea tubulosa</i>	Farelo de Trigo
Matéria Seca	92,2	85,8	90,9	89,8
Matéria Mineral	3,8	4,0	3,6	7,1
Matéria Orgânica	95,8	96,0	96,4	83,9
Proteína Bruta	7,2	17,7	12,4	17,4
Fibra Detergente Neutro	26,7	32,2	44,4	51,1
Fibra Detergente Ácido	23,5	24,9	37,4	7,1
Carboidratos Totais	87,4	77,9	83,9	73,1
Carboidratos Não Fibrosos	60,7	45,7	39,5	22,0
Hemicelulose	3,4	7,3	7,0	44,0
Celulose	18,6	12,6	13,3	3,5
Lignina	4,9	12,3	24,1	3,6
NIDA ¹	0,1	0,2	0,4	--
NIDN ²	0,2	0,3	0,3	--
Extrato Etéreo	1,6	0,4	0,1	2,4

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

Aproximadamente 2 kg de cada farelo foram submetidos à extração por percolação com etanol a 95%, em seguida, esta solução foi concentrada a vácuo, a uma temperatura em torno de 70°C, em evaporador rotatório, obtendo, assim, os extratos etanólicos brutos (222g, 230,2g e 381,6g para farelo de vagem de *P. juliflora*, *S. saman* e *S. tubulosa*, respectivamente). O aspecto desses extratos era viscoso de coloração castanho-escuro.

2.2 Delineamento Experimental

As análises *in vitro* consistiram no estudo dos efeitos dos extratos etanólicos dos farelos das vagens de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* sobre o metabolismo da microbiota ruminal em fluido coletado do rúmen de vacas da raça Holandesa fistuladas e incubado em estufa sob temperatura constante (39°C). Foram realizadas duas rodadas com três brancos e três repetições por tratamento. Para este ensaio de produção de gases, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3x3, tendo como tratamentos a adição de 10 mL de uma solução de dimetilsulfóxido (1% v/v) como controle e três extratos etanólicos diluídos em água, utilizando como solvente o dimetilsulfóxido, perfazendo 1% do volume total da solução, como descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Tratamentos utilizando farelo de trigo associado aos extratos etanólicos obtidos do farelo de vagem de *Prosopis juliflora* (P), farelo de vagem de *Samanea saman* (S) e do farelo de vagem de *Samanea tubulosa* (T).

Item	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3
Extrato de P	Controle 1 e 2	300mg/10mL	1200mg/10mL
Extrato de S	Controle 1 e 2	300mg/10mL	1200mg/10mL
Extrato de T	Controle 1 e 2	300mg/10mL	1200mg/10mL
Controle 1	10mL de Solução DMSO* 1%		
Controle 2	10 mL de Água Destilada		

*DMSO – Dimetilsulfóxido.

2.3 Produção de gases

A técnica de produção de gases *in vitro* foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Vitória da Conquista-Bahia-Brasil, conforme o protocolo de análise descrita por Mauricio et al. (1999), considerando o volume de gás produzido a partir da medição da pressão gerada pelo acúmulo de gás durante o processo fermentativo das amostras incubadas.

A cada frasco de 160 mL foi adicionado 80 mL de meio tamponante contendo micro e macrominerais e tamponantes (THEODOROU et al., 1994), saturados com CO₂, 10 mL de solução de extrato (Tabela 2) e 1 g de farelo de trigo, com 3 réplicas para cada extrato, além destes foram incluídos 3 frascos contendo fluido ruminal e meio nutriente, que serviu como controle.

O meio nutriente foi obtido misturando uma Solução-tampão (200 mL), que continha NH_4HCO_3 (4,5 g/ L), e NaHCO_3 (39,4g/ L) foi misturado com água destilada (500 mL), solução de macrominerais (200mL; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 10,6g/ L; KH_2PO_4 , 7,0g/ L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g/ L), solução micromineral (0,1 mL; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 148,5g/ L; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 112,5g/ L; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 11,3g/ L; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 90,0g/ L;), solução de meio B (60 mL; cisteína HCl, 7,0g/L; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 7,0g/ L; NaOH, 1,8g/ml) e solução de resazurina (1,0mL; 0,01g/ L).

O fluido ruminal utilizado nas inoculações foi composto por uma mistura de fluidos de três vacas fistuladas cirurgicamente no rúmen, não lactantes, mestiças, mantidas em confinamento, cuja dieta era exclusiva de volumoso (*Brachiaria* spp.).

As vacas foram mantidas em jejum hídrico e alimentar nas 12 horas que antecederam a coleta do fluido ruminal. Após a coleta, o fluido ruminal de cada vaca foi armazenado em garrafas térmicas pré-aquecidas à temperatura de 39°C para o transporte até o laboratório, onde foram filtrados em tecido de nylon com porosidade de 100 micras, misturados nas mesmas proporções e saturados com CO_2 , e mantidos em banho-maria a 39°C.

O fluido ruminal (10 mL) foi inoculado nos frascos contendo as amostras, como 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 100 mL.

2.4 Horários de leitura

As leituras de pressão dos gases produzidos durante as fermentações foram realizadas às 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20 e 24 horas após o início das incubações. As leituras de pressão dos gases (psi – pressão por polegada quadrada) foram realizadas de forma semiautomática por intermédio de um transdutor de pressão (Tipo T443A, Bailey e Mackey, Inglaterra) com uma agulha acoplada a sua extremidade. As medidas de pressão obtidas foram ajustadas para o volume de gases, conforme a equação proposta por Figueiredo et al. (2003), para a altitude local:

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

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

2.5 Degradabilidade *in vitro* e pH ruminal

As degradações *in vitro* dos substratos foram determinadas às 8; 16 e 24 horas após a inoculação. A degradabilidade ruminal foi estimada como a diferença entre a quantidade de amostra colocada para fermentar em cada frasco e a quantidade de resíduo recuperado por filtração em cadinho de porosidade nº 1 (Vidrotec®), de pesos previamente conhecidos.

Para estimar o efeito dos extratos etanólicos sobre o pH do meio ruminal, determinou-se o pH, por meio de potenciômetro digital, no conteúdo dos frascos a cada tempo de degradação, 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*.

2.6 Produção de biomassa microbiana

A produção de biomassa microbiana foi estimada a partir da diferença obtida entre a degradabilidade verdadeira e aparente da matéria seca.

Em uma das réplicas foi determinada a degradabilidade aparente da MS através da filtração direta do resíduo obtido, após a fermentação da amostra em cadinho de vidro nº 1, e posterior secagem em estufa a 105°C, durante 24 horas (MAURICIO et al., 1999). Para determinação da degradabilidade verdadeira da MS, a outra réplica da mesma amostra foi submetida à digestão com solução detergente neutro por 1 hora, em seguida, filtrada em cadinho de vidro nº 1 e seca em estufa a 105°C, por 24 horas (GOERING e VAN SOEST, 1970). As degradabilidades foram determinadas em cada tempo de degradação (8; 16 e 24h de incubação).

A biomassa microbiana ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ de MS digestível) foi obtida de acordo com Blümmel et al. (1997):

$$\text{Biomassa microbiana (mg. } 100 \text{ mg}^{-1}) = \text{DVMS (mg. } 100 \text{ mg}^{-1}) - \text{DAMS (mg. } 100 \text{ mg}^{-1})$$

Em que DVMS corresponde à degradabilidade verdadeira *in vitro* da MS e DAMS à degradabilidade aparente *in vitro* da MS.

2.7 Análise Molecular da População de Microrganismos (Bacteria, Archaea)

Amostras do líquido ruminal dos frascos de incubação foram coletadas nos tempos 6; 12; 24;36 e 96 horas de incubação. As amostras coletadas foram imediatamente armazenadas em congelador a 20°C negativos.

Posteriormente, 1,5 mL de cada amostra foram colocados em tubos com capacidade de 2 mL e centrifugados por 5 minutos a 1800 x g e realizado quadruplicatas das amostras. As amostras foram submetidas a um processo de lavagem com PBS 1x (Solução Salina Tamponada) e centrifugações a 7 000 x g por 15 minutos. Foi adicionado ao pélete, 600 µL de TESC (10 M Tris-base, 1 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,3) juntamente com 30 µL de Tween 80 (Merck) e homogeneizado. A amostra foi submetida ao banho ultrassônico Magiclean 1600 (Unique®) por 2 minutos, para que houvesse desfloculação das partículas bacterianas que, possivelmente, poderiam estar aderidas à matéria orgânica.

Após o banho ultrassônico, as amostras foram novamente centrifugadas por 3 minutos a 50 x g e, coletou-se o sobrenadante que, por sua vez, foi centrifugado a 7 000 x g por 5 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o pélete foi ressuspensão em 700 µL de Tampão de Lise (50mM:50mM:500mM), 12 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹) (Promega) e 12 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) foram adicionados às amostras e homogeneizou-se pela inversão dos tubos. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 65°C, por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos.

A lise física das células bacterianas foi realizada por meio de choque térmico, em três ciclos, 10 minutos em ultra *freezer* (80°C negativos) e 5 minutos em banho-maria a uma temperatura de 80°C. Um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, e a mistura foi gentilmente homogeneizada. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1 800 x g e a fase aquosa foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,7 volume de isopropanol gelado (J.T. Barker) e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. A solução foi misturada suavemente (5-10 vezes) e mantido a 20°C negativos por 16 h. Foi obtido o pélete das amostras por centrifugação durante 5 minutos a 10 000 x g, o pélete foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspensão em 50-100 µL de TE clássico (10 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0).

Quando necessário, o DNA extraído foi purificado em mini-colunas, empacotadas com matriz de gel Sephadex G-200, equilibradas com TE clássico, segundo (TSAI e OLSON, 1992). Um volume de 250 µL do eluente foi adicionado às colunas juntamente com o DNA de cada amostra, e posteriormente incubadas em banho-maria (50-60°C) por 10 minutos, sendo, em seguida, centrifugadas por 2 minutos a 1 800 x g.

As análises da diversidade microbiana foram efetuadas através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Na amplificação dos fragmentos do DNA, foram utilizadas as sequências de nucleotídeos dos iniciadores para o Domínio *Bacteria*: 357F (5' - CAC GGG GTA CGG GAG GCA GCA G - 3') e 518R (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Integrated DNA Technologies, Inc.), com o grampo de GC na terminação 5' do iniciador *forward* (5' - CGC CCG CCG CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG - 3') (MUYZER et al., 1993; MCEWAN et al., 2005). A região variável V3 de 16S rDNA foi utilizada por ser uma região conservada de bactérias comumente encontradas no trato gastrointestinal e amplificam aproximadamente 200 bp do gene bacteriano. Para o Domínio *Archaea*, foi utilizado o par de iniciadores 1100F (5' - AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G - 3'), junto com o grampo de GC e 1400 R (5' - CGG CGA ATT CGT CGT AGG AGC AGG GAC -3'), descritos por Kudo et al. (1997). A utilização do grampo de GC acoplado a um dos iniciadores impede a completa separação das fitas do DNA, aumentando a sensibilidade da Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) (SHEFFIELD et al., 1989).

A mistura para reação da PCR (25 µL) para o Domínio *Bacteria* consistiu de: 17,65 µL de Água Milli-Q estéril, 1 x do Tampão da *Taq* polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador (357F com grampo de GC e 518R), 200 µM de cada um dos dNTP e 0,5 U da Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (*c.* 20 ng) em um volume final de 25 µL. A amplificação foi obtida seguindo o programa: desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 60s, 55°C por 60s, 72°C por 60s, e a PCR foi finalizada pela extensão a 72°C por 30 minutos. Para o Domínio *Archaea*, foi realizada a PCR, usando uma mistura de 16,85 µL de Água Milli-Q estéril, 1 x do Tampão da *Taq* polimerase, 2,1 mM de MgCl₂, 280 µM de cada iniciador (1100F com grampo de GC e 1400R), 280 µM de cada um dos dNTP e 2,5 U da Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (*c.* 20ng) em um volume final de 25 µL. A amplificação foi obtida seguindo o programa: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 90s, e extensão final a 72°C por 3 minutos. As reações foram analisadas em gel de agarose a 2% (m/v) corado com brometo de etídio, com transiluminador de luz ultravioleta (KODAK).

A DGGE foi realizada utilizando o Sistema para Análise de Mutações CDC 20 x 20 cm (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), sendo 20 µL dos produtos de PCR colocados em gel de poliacrilamida a 8% em 0,5 mmol L⁻¹ com gradiente desnaturante de 25% a 60% em tampão 1x Tris-Acetato-EDTA e 25% a 55% em tampão 0,5x Tris-Acetato-EDTA para análise da diversidade bacteriana e de arqueas, respectivamente, ambas em uma corrida a voltagem de 85V por 20 minutos e, em seguida, de 200 V por 5h a 60°C. As bandas de DNA foram visualizadas por coloração com prata.

2.8 Análises Estatísticas

A regressão da produção para os parâmetros fermentativos, consumo e comportamento ingestivo utilizou-se o Proc MIXED do SAS (LITTEL et al., 1996). O modelo estatístico de regressão linear múltipla com duas variáveis independentes (ou seja, os níveis de substituição e tempo de coleta de dados), repetições por tratamento, foi:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 Tr + \beta_2 Tr^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 TrxT + \epsilon r_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado de Y resposta variável nos níveis Tr e T, na repetição k; β_n é o coeficiente de regressão associado com o fator de interesse ($X_{1i}, X_{1i}^2, X_{2j}, X_{2j}^2, X_{1i}X_{2j}$); X_{1i} é o valor do nível X_{1i} do X_1 variável independente; X_{2j} é o valor do nível de X_{2j} do X_2 variável independente; ϵr_{ijk} é o efeito do resíduo da regressão associado com cada Y_{ijk} valor observado, sendo $\epsilon \sim \text{NID}(0, \sigma_\epsilon^2)$. Em um delineamento inteiramente casualizado, $\epsilon r_{ijk} = \epsilon_{ijk} + f_{aij}$, em que $f_{aij} = \mu_{Y_{ij}} - \hat{Y}_{ij}$, em que f_{aij} é a falta de ajuste do modelo para o Y_{ij} ponto.

A análise dos dados foi realizada pelo procedimento MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). Os efeitos dos tratamentos e os tempos foram decompostos em contrastes polinomiais lineares a 4º grau. Além disso, a interação dos tratamentos ao longo do tempo foi examinada,

usando a opção de fatia de MIXED e contrastes. A configuração mais baixa da informação Akaike critério (AIC) foi obtida utilizando o componente de variância (VC):

$$Y_{ijk} = \mu + Tr_i + T_j + Tr_iT_j + \varepsilon_{ijk}; NID(0; \sigma^2)$$

Em que: Tr = extratos (0, 300 e 1200 mg/ 10 mL) e T = tempo (8, 16 e 24 h).

Para escolher a melhor equação, os fatores Tr e T e as interações não significativas em $P < 0,05$ foram retiradas do modelo. Os contrastes da interação foram utilizados para comparar o efeito dos níveis de extratos e interações ao longo do tempo (8, 16 e 24 h) em pH, produção de gases não acumulada, degradabilidade verdadeira da matéria seca, produção da biomassa. A partir dos dados gerados, obteve-se uma resposta de superfície para a produção de gases para cada extrato estudado.

As técnicas estatísticas multivariadas foram realizadas para avaliar a estrutura multivariada contida nos dados originais. A partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel. Para identificar a presença ou não de bandas, codificadas por 1 e 0, respectivamente (KOZDRÓJ e ELSAS, 2001). A partir dessa matriz de dados foi feita a análise de agrupamento por dendograma, para a qual foi utilizado, para o cálculo da similaridade entre os indivíduos e pelo método de agrupamento UPGMA (método das médias das distâncias) com o índice de semelhança Jaccard (1901), por meio do programa estatístico Past.

A análise Biplot aplicada às Componentes Principais (CP) foi utilizada para verificar a correlação entre as variáveis analisadas e identificar quais variáveis sofreram maior influência das dietas. Para esta análise, foi utilizado o programa Past. Para a confecção do gráfico de riqueza de espécies e os diagramas de Venn, foram utilizadas a Microsoft Excel 2010 e a Microsoft Power Point 2010, utilizando o padrão de bandas geradas no perfil do DGGE, considerando apenas os níveis de substituição do milho pelo farelo da vagem de algaroba.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sobre o pH ruminal, observou-se, para cada extrato etanólico avaliado, influência da interação níveis de extrato vs tempo de incubação ($P < 0,001$). O comportamento do pH da fermentação *in vitro* sem utilização dos extratos, farelo de trigo associado com DMSO, foi quadrático, reduzindo em 0,20 pontos das 8 às 16 horas após a incubação (Tabela 3). Os menores valores observados foi com a utilização do farelo de trigo associado ao extrato de *Samanea saman* com 16 e 24 horas de incubação, na concentração de 1200 mg/10 mL, os maiores valores de pH foram encontrados utilizando-se o farelo de trigo associado ao extrato de *Samanea tubulosa* na concentração de 1200 mg/10 mL, em 8 horas após incubação (Tabela 3).

Os valores encontrados localizam-se dentro do limite ideal para proporcionar a digestão da fibra, exceto para o tratamento que foi utilizado extrato de *S. saman* na concentração de 1200 mg/ 10 mL, às 24h de incubação. Experimentos têm comprovado que a efetividade do crescimento das bactérias predominantes no rúmen se altera consideravelmente com o pH. As bactérias celulolíticas e as bactérias metanogênicas são afetadas intensamente, uma vez que o pH do rúmen decresce para abaixo de 6,2 (ØRSKOV, 1988; CECAVA et al., 1990). Valores inferiores a 6,0 inibem a taxa de digestão e aumentam o tempo de colonização para degradação da parede celular (STROBEL e RUSSELL 1986; OWENS e GOETSCH, 1988; MERTENS, 1992). Quando o pH decresce, ocorre o favorecimento de bactérias amilolíticas e resistentes à acidez, enquanto microrganismos celulolíticos diminuem, assim, a atividade relativa da amilase em relação à celulase aumenta, isso explica a relação inversa entre biomassa e degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS) (LÓPEZ et al., 1998), observada com a adição dos extratos etanólicos (Figura1), já que microrganismos amilolíticos apresentam maior taxa de crescimento, quando comparados com os fibrolíticos. Essa inversão, possivelmente, corresponde à fermentação da fração de digestão rápida, que é a principal fonte de energia para os microrganismos ruminais, sustentando seu crescimento inicial.

Tabela 3 – pH de fermentação *in vitro* de farelo de trigo associado a níveis crescentes de extrato etanólico, 0; 300 e 1200 mg/10 mL de *Prosopis juliflora* (P), *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T) após 8, 16 e 24 horas de incubação.

Tratamento	Tempo de incubação (horas)			EPM	Efeito de Interação*					
	8	16	24		0		300		1200	
	pH				L	Q	L	Q	L	Q
<i>Prosopis juliflora</i>										
P0	6,91	6,71	6,71	0,020						
P300	6,70	6,58	6,64	0,014	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7706	0,1352
P1200	6,19	6,05	6,25	0,072						
<i>Samanea saman</i>										
S0	6,91	6,71	6,71	0,020						
S300	6,62	6,55	6,58	0,016	<0,0001	<0,0001	0,3008	0,0739	<0,0001	0,1038
S1200	6,03	5,81	5,68	0,047						
<i>Samanea tubulosa</i>										
T0	6,91	6,71	6,71	0,020						
T300	6,91	6,74	6,66	0,031	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T1200	7,09	6,69	6,60	0,064						

*L, Q – efeito linear e quadrático;

Os comportamentos para a produção de gases para cada extrato etanólico utilizado nesse experimento encontram-se na Figura 4, Figura 5 e Figura 6. A produção de gases não cumulada foi afetada pelo tempo (8; 16 e 24 horas), levando a uma interação significativa entre as concentrações de extrato etanólico e os tempos de incubação.

O extrato de *P. juliflora* apresentou um comportamento cúbico em função do tempo, a maior produção de gases ocorreu no intervalo de tempo de 15 a 20 horas de incubação, quando se utilizou concentração abaixo de 600 mg/ 10 mL, e reduções na produção de gases foram estimadas quando se utilizou concentração acima de 1200 mg/ 10 mL 2h, após a incubação ou acima de 24h de incubação (Figura 4). Similarmente, ocorreu para o tratamento utilizando o extrato de *S. tubulosa* (Figura 6), estimando-se que a utilização de concentrações abaixo de 100 mg/ 10 mL desse extrato proporciona maior produção de gases após 12h de incubação. Já para o extrato de *S. saman*, o comportamento apresentou-se quadrático em função do tempo, observando-se maiores valores após as 20 horas de incubação na concentração de 1200 mg/ 10 mL e menor produção de gases abaixo da concentração de 300 mg/ 10 mL (Figura 5). As menores taxas de produção de gases foram observadas no tratamento com extrato etanólico de *S. tubulosa*, o que pode ser atribuída à retenção de carbono no meio, o que em linhas gerais, possivelmente decorrente da modificação da relação acetato:propionato, com aumento da proporção molar do propionato.

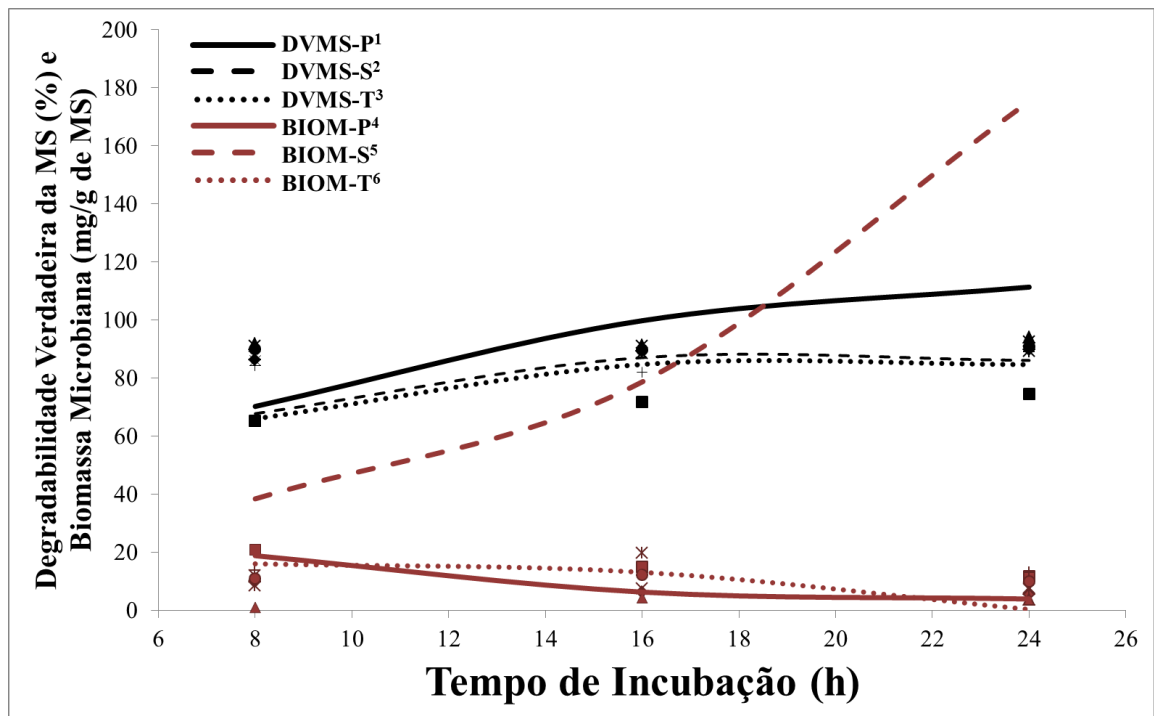


Figura 1 – Degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS; %) e biomassa microbiana (mg/g de MS) de amostras contendo níveis crescentes de extrato etanólico, 0; 300 e 1200 mg/10 mL de *Prosopis juliflora* (P), *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T) após 8; 16 e 24 horas de incubação.

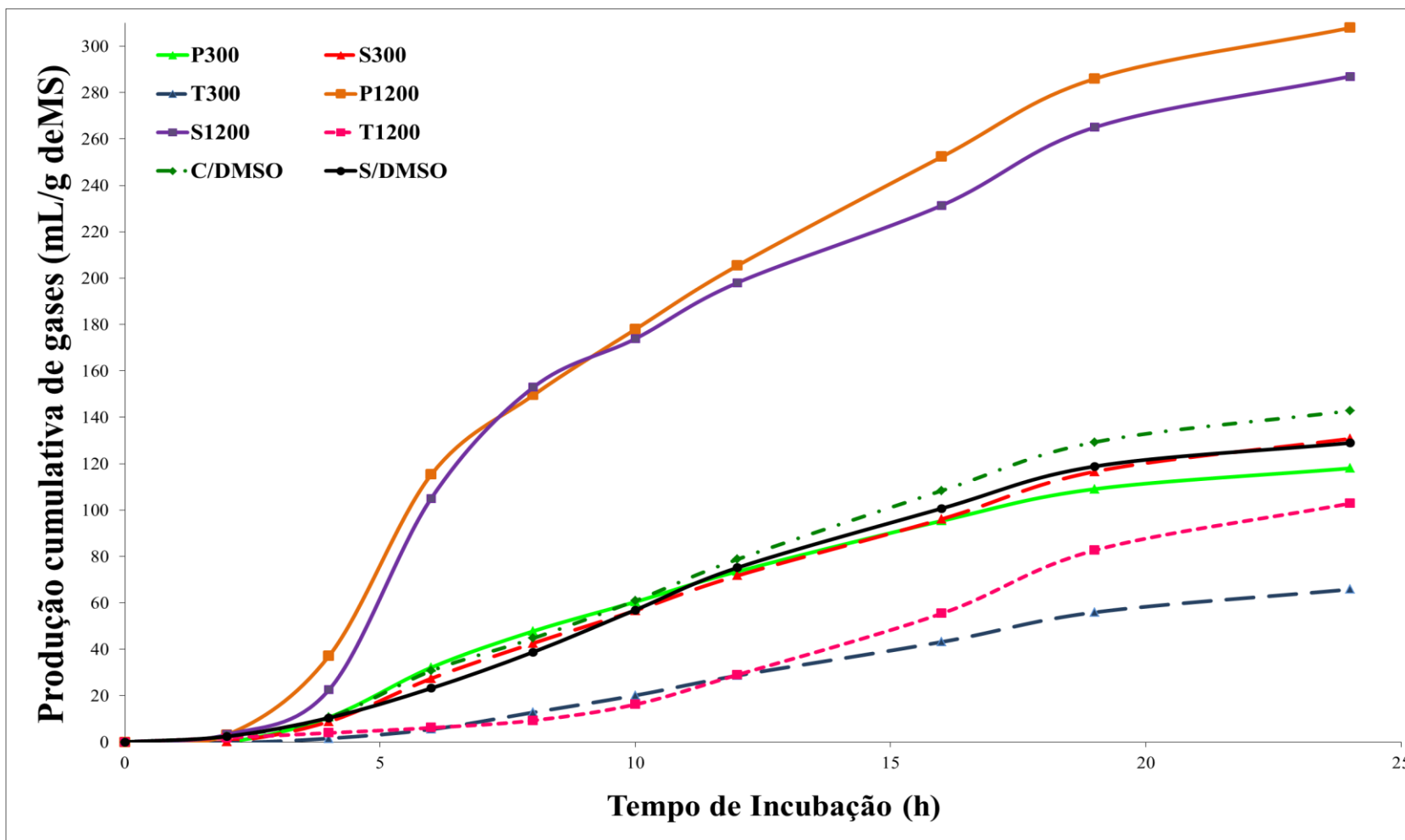


Figura 2 – Produção de gases cumulativa da fermentação *in vitro* de farelo de trigo associado a concentrações crescentes (300 e 1200 mg/ 10 mL) de extrato etanólico de *Prosopis juliflora* (P), de extrato etanólico de *Samanea saman* (S) e de extrato etanólico de *Samanea tubulosa* (S) e tratamentos controle com dimetilsulfóxido (C/DMSO) e sem dimetilsulfóxido (S/DMSO) até 24 horas de incubação.

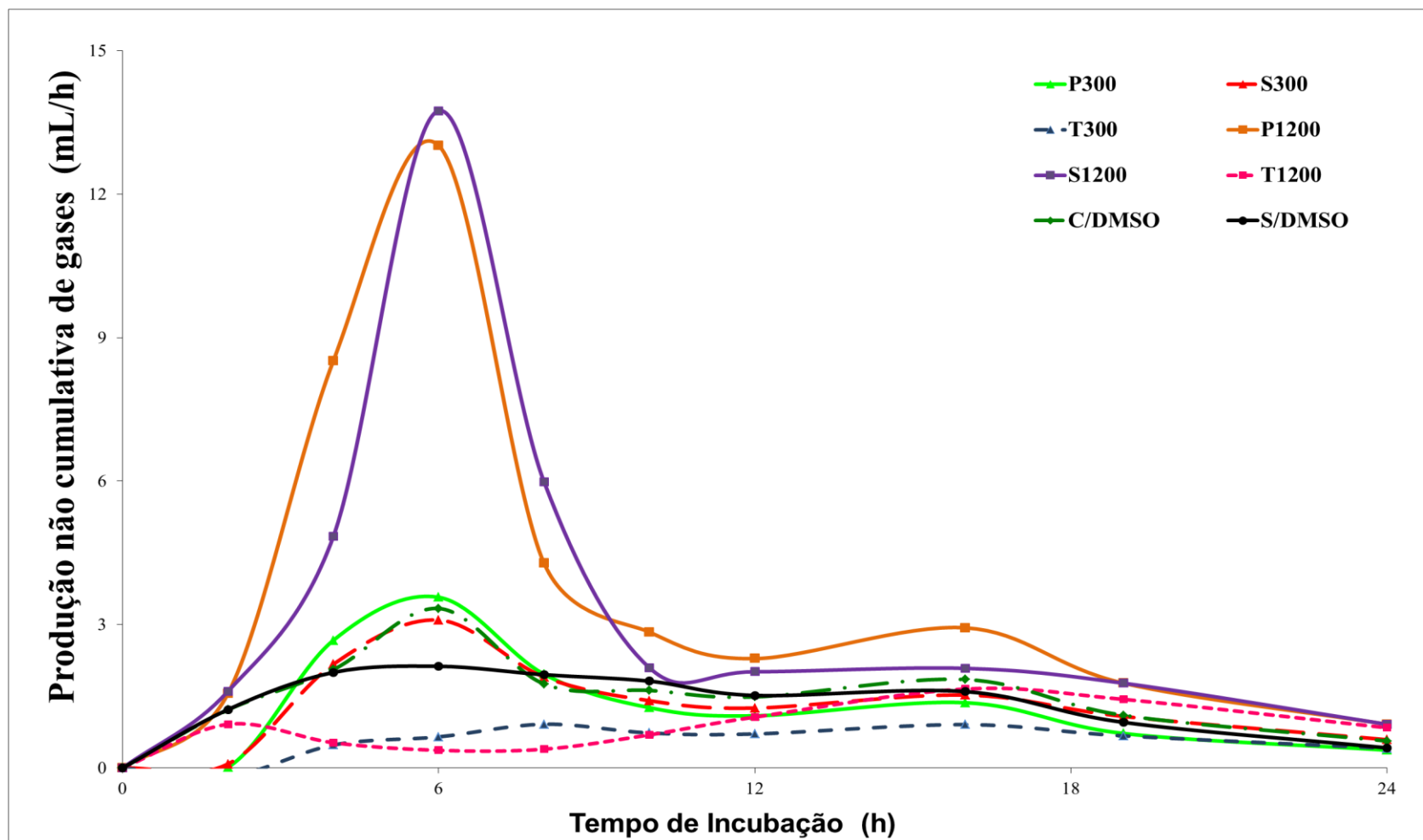


Figura 3 – Produção não cumulativa de gases da fermentação *in vitro* de farelo de trigo associado a concentrações crescentes (300 e 1200 mg/ 10 mL) de extrato etanólico de *Prosopis juliflora* (P), de extrato etanólico de *Samanea saman* (S) e de extrato etanólico de *Samanea tubulosa* (S) e tratamentos controle com dimetilsulfóxido (C/DMSO) e sem dimetilsulfóxido (S/DMSO) até 24 horas de incubação.

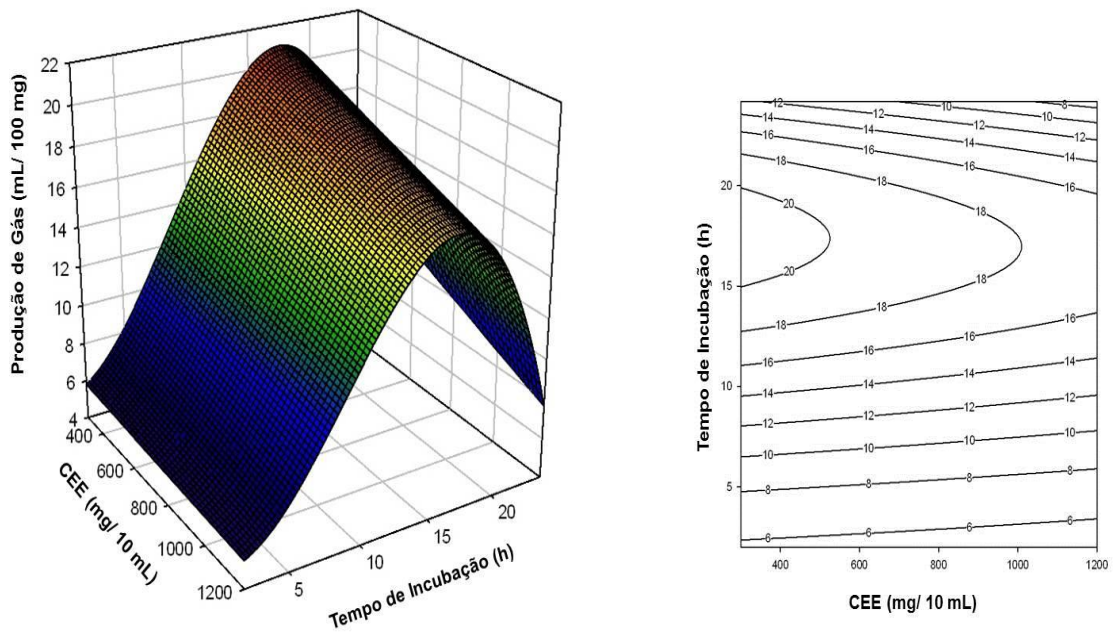


Figura 4 – Superfície de resposta e curva de contorno para produção não cumulativa de gases (mL/h) durante a fermentação de amostras contendo concentrações crescentes extrato de *Prosopis juliflora*. CEE – concentração de extrato etanólico.
 $\hat{Y} = 5,36^* - 0,00024Tr \times T^* + 0,16T^2 - 0,006T^3$.
 *significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade.

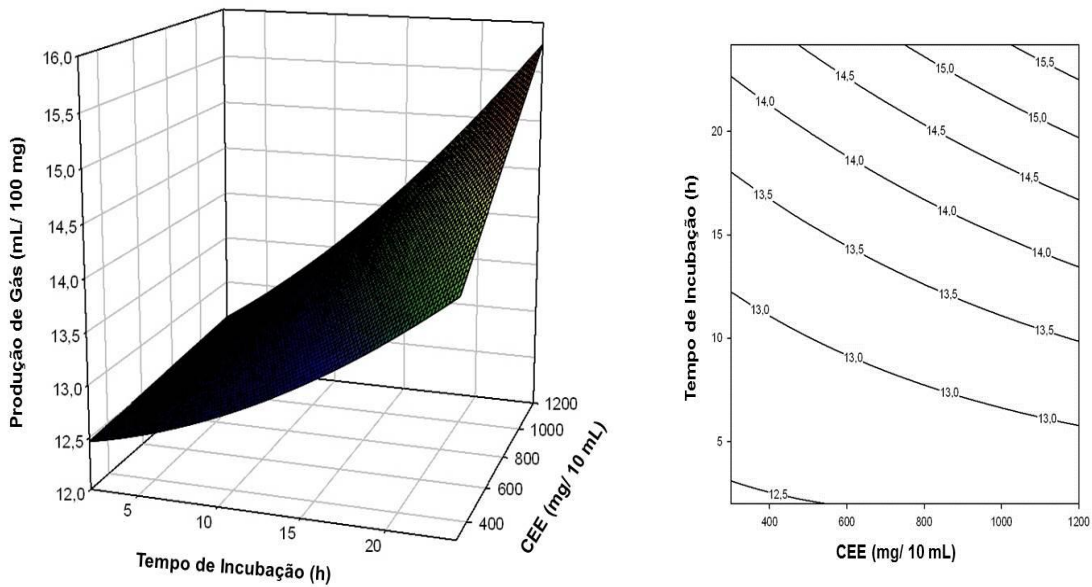


Figura 5 – Superfície de resposta e curva de contorno para produção não cumulativa de gases (mL/h) durante a fermentação de amostras contendo concentrações crescentes extrato de *Samanea saman*. CEE – concentração de extrato etanólico.
 $\hat{Y} = 12,41^* + 0,000075Tr \times T^{***} + 0,0021T^2$.
 *significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade;
 significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; *significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

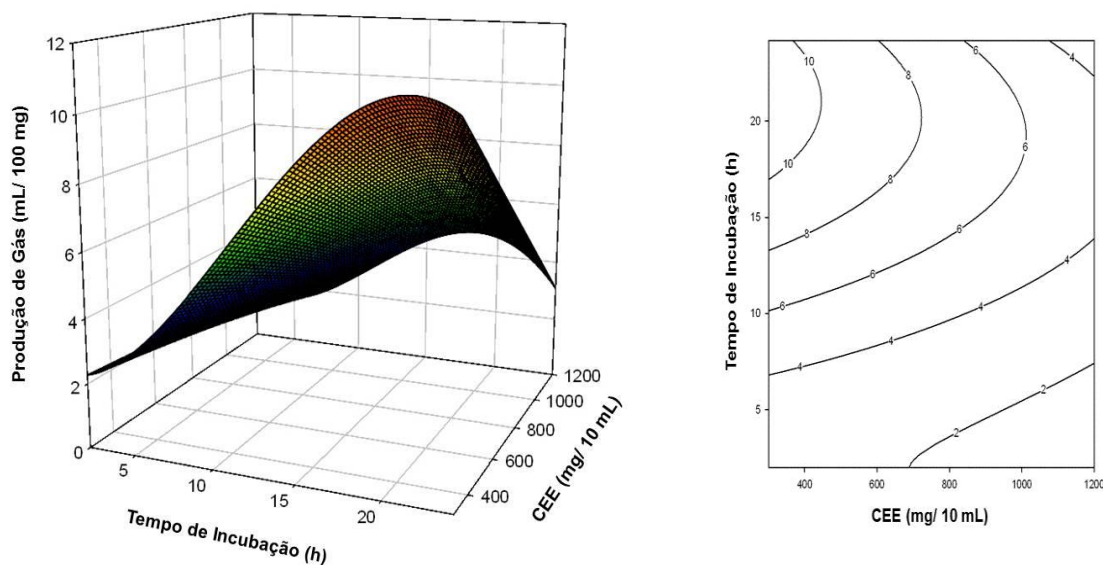


Figura 6 – Superfície de resposta e curva de contorno para produção não cumulativa de gases (mL/h) durante a fermentação de amostras contendo concentrações crescentes extrato de *Samanea tubulosa*. CEE – concentração de extrato etanólico.
 $\hat{Y} = 2,2281^* - 0,00035T^* + 0,06747T^{2*} - 0,00202T^{3*}$.
 *significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade.

O farelo de trigo, associado ao extrato etanólico de *S. tubulosa*, proporcionou menor produção de gases em relação aos demais extratos, possivelmente, esse extrato contribuiu para elevação do pH ruminal observado pelo aumento linear crescente do pH, influenciado pelos níveis de concentração desse extrato. Em situações de pH abaixo de 6,2, ocorre redução na digestão de fibra, já que as bactérias celulolíticas são sensíveis a pH inferior a 6,2 (ØRSKOV, 1988; CECAVA et al., 1990), ocorrendo na faixa de 6,7 a 7,1 o ponto ótimo para a digestão da fibra, faixa encontrada para a adição desse extrato (Tabela 3).

Além disso, o pH ruminal é um fator “ambiental” importante na distribuição dos organismos, exercendo um papel regulador na definição do ambiente e diversidade de microrganismos, e estando correlacionado positivamente com o nitrogênio amoniacal e relação acetato:propionato. O pH elevado estimula o crescimento microbiano, podendo ser observado que a medida em que se aumentou o nível de extrato etanólico de *S. tubulosa* houve um aumento no número de bandas observadas para o domínio *Bacteria* (Figura 7) (Figura 10). Entretanto, o mesmo não foi notado para o domínio *Archaea*, em que se observa os menores resultados (T300 e T1200) (Figura 7) (Figura 11) para os tratamentos em que houve menor produção de gases. Sugerindo duas hipóteses, que este extrato possua atividade seletiva de microrganismos, com provável ação inibidora de metanogênicos ou que uma redução na comunidade de protozoários possa ter ocorrido neste tratamento, o que levou a uma redução das metanogênicas associadas a estes microrganismos por aderência ou endossimbiose (NEWBOLD

et al., 1995; TOKURA et al., 1999; HEGARTY et al., 2008). Sabe-se, ainda, que os protozoários ciliados são responsáveis por 9 a 37% da produção de metano no rúmen (HOOK et al., 2010).

Em estudos realizados com métodos de produção de gases *in vitro*, utilizando plantas tropicais, foram observadas reduções nas produções de gases, bem como na DVMS, alguns desses efeitos têm sido atribuídos à presença de taninos e saponinas (GETACHEW et al., 2002; NGAMSAENG et al., 2006; BABAYEMI et al., 2009; BUNGLAVAN et al., 2010).

Neste trabalho foi possível observar diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR, tanto para o domínio *Bacteria* quanto *Archaea*, demonstrado pelo número e intensidades diferentes de bandas que, possivelmente, trata-se de espécies distintas. Esta variação no padrão de bandas é notada entre os tratamentos e também em função do tempo de incubação (Figura 8) (Figura 9). Os resultados obtidos mediante a PCR-DGGE foram utilizados para construir os dendogramas, bem como os diagramas de Venn, que se apresentam na Figura 10 e Figura 11.

A DGGE demonstrou eficiência na separação das bandas dos produtos de PCR gerados pelo par de iniciadores para ambos os domínios estudados, possivelmente devido ao tempo de corrida da DGGE e ao gradiente desnaturante utilizado. Concordando com Sigler et al. (2004), o tempo de 5 horas a 200V foi o mais adequado para a obtenção de uma melhor separação das bandas no gel. Esses mesmos autores perceberam que longos períodos de eletroforese acabam por instabilizar o gradiente desnaturante, causando a perda da capacidade em separar as bandas no gel, de acordo com sua sequência nucleotídica e evidenciando claramente populações predominantes.

O dendograma Jaccard (Figura 10) (Figura 11), gerado a partir de DGGE, para bactérias e arqueas ruminais, apresentou aproximadamente 10% de similaridade entre todos os grupos avaliados. Observa-se que houve agrupamento bem definido para cada extrato etanólico avaliado, ainda podendo notar, quando se compara a distribuição de bandas entre os tratamentos, que existem variações, algumas bandas são reduzidas ou desaparecem, porém, torna-se evidente a presença de novas bandas (Figura 8) (Figura 9).

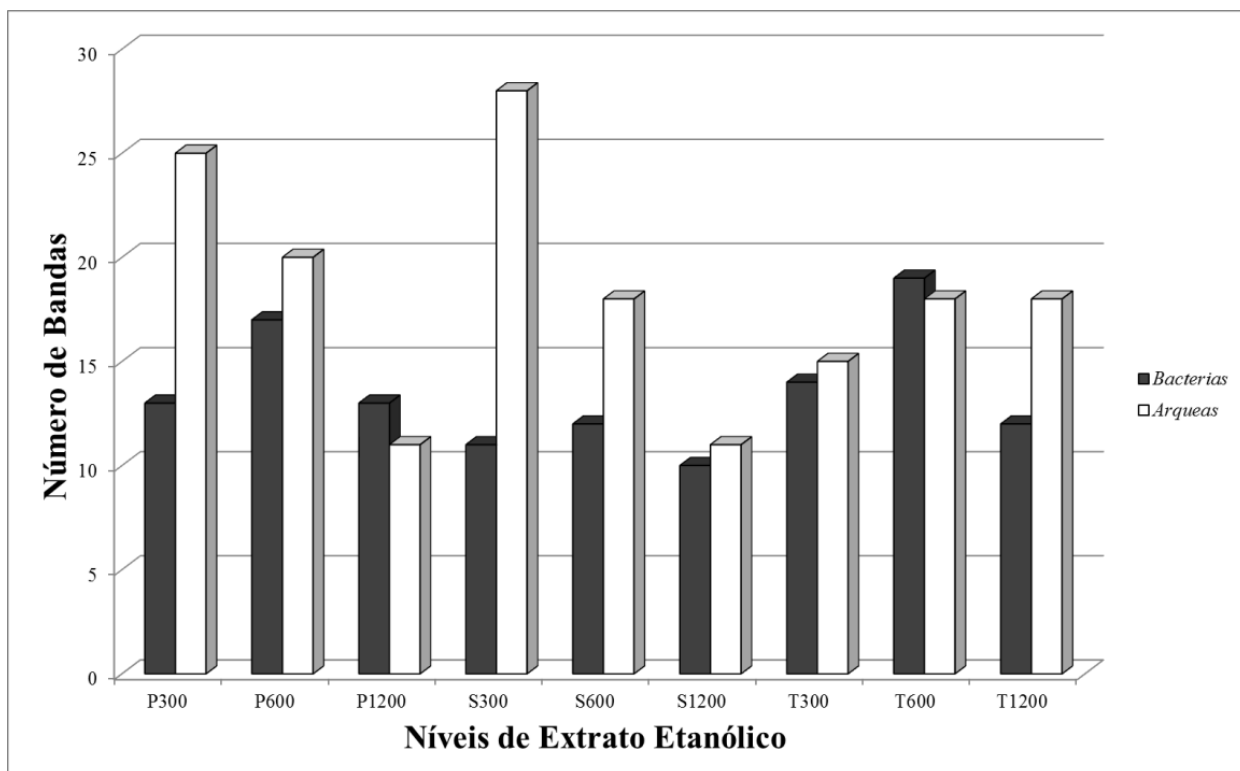


Figura 7 – Riqueza de bandas para os domínios *Bacteria* e *Archaea*, considerando os níveis de concentração, 300; 600 e 1200 mg/10 mL, dos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* (P); *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T).

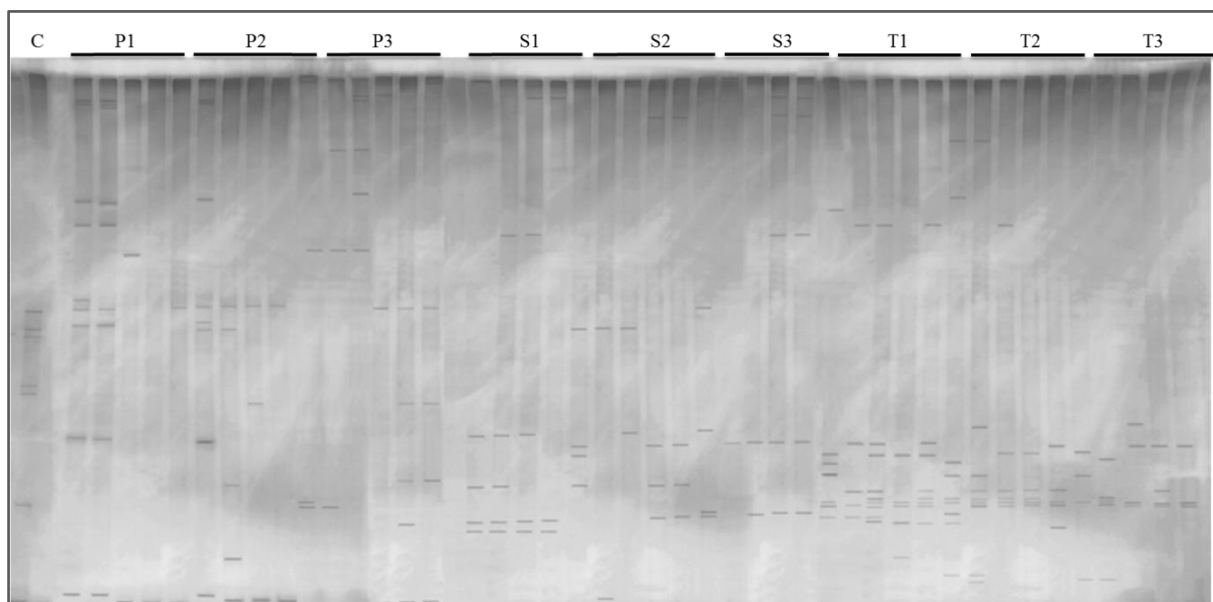


Figura 8 – Perfil de bandas da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) a partir de PCR amplificado com V3-16S DNAr da comunidade bacteriana com base na adição de farelo de trigo, associado com diferentes níveis (1-3: 300; 600 e 1200 mg/10 mL) de extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* (P), *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T), após incubação (6, 12, 24, 36 e 96 h). C – controle.

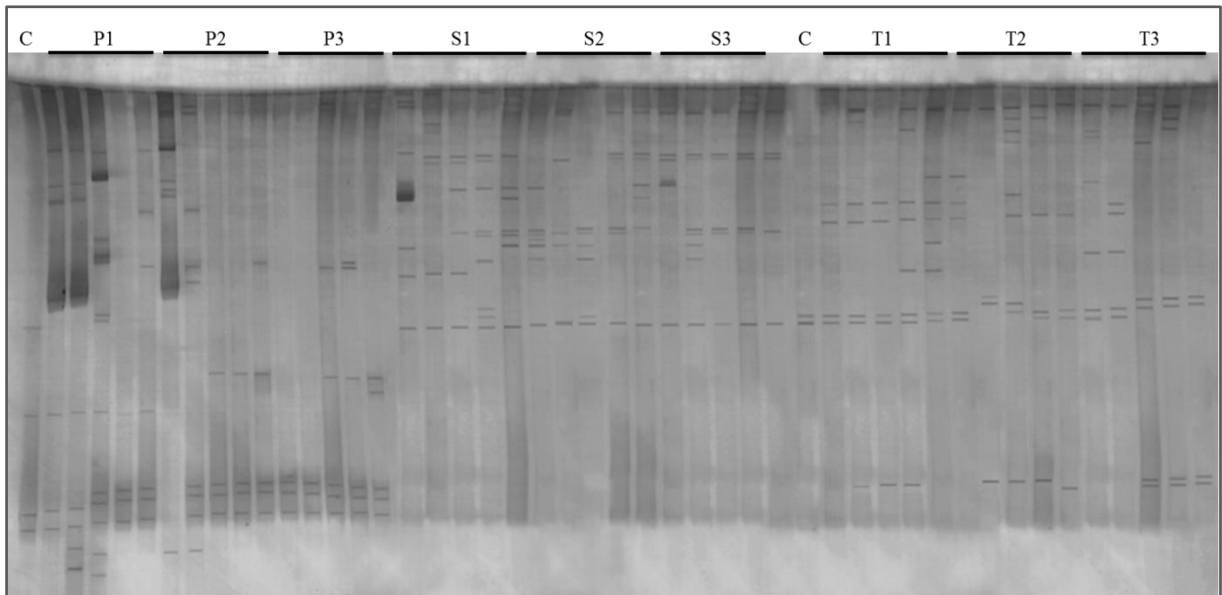


Figura 9 – Perfil de bandas da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) a partir de PCR amplificado para a comunidade de arqueas metanogênicas com base na adição de farelo de trigo, associado com diferentes níveis (1-3: 300; 600 e 1200 mg/10 mL) de extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* (P), *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T), após incubação (6, 12, 24, 36 e 96 h). C – controle.

O diagrama de Venn demonstra claramente o agrupamento de bandas (espécies) que podem ser compartilhadas ou específicas de cada “grupo amostrado” (Figura 10C) (Figura 11C). Na avaliação das comunidades microbianas, pode-se observar que houve uma redução no número de bandas para a população bacteriana, quando houve a incubação de farelo de trigo associado com 1200 mg/ 10 mL tanto com extrato etanólico de *P. juliflora* quanto de *S. saman* (Figura 7) (Figura 10C). Isso se deve, provavelmente, ao pH mais baixo (Tabela 3), refletindo principalmente sobre as bactérias celulolíticas que são mais sensíveis a esta redução, além das metanogênicas e protozoários, que também são afetados com a redução do pH ruminal (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988). Entretanto, isto não é visualizado com a adição do extrato de *S. tubulosa*.

Para a comunidade de arqueas, observou-se uma acentuada redução no número de bandas, quando se incubou farelo de trigo associado aos diferentes níveis de concentração dos extratos etanólicos de *P. juliflora* e de *S. saman* e verificou-se aumento no número de bandas desta população de microrganismo na utilização do extrato de *S. tubulosa*. Um dos fatores que pode ter interferido sobre esta população foi o pH do meio que reduziu ou aumentou com a adição dos níveis de extrato. Outro fator pode ser a redução na comunidade de protozoários, o que levou a uma redução das metanogênicas associadas a estes microrganismos (NEWBOLD et al., 1995; TOKURA et al., 1999; HEGARTY et al., 2008). Contudo, não se observou redução na produção de gases com a adição dos extratos etanólicos de *P. juliflora* e de *S. saman* (Figura

2) (Figura 3), pressupondo que tenha havido redução na produção de metano, mas não na produção de CO₂.

É possível que, neste estudo, com a inclusão de níveis de concentração de extratos etanólicos de *P. juliflora* e de *S. saman*, tenha ocorrido maior taxa de fermentação. Provavelmente, o extrato bruto obtido por percolação com etanol contenha oligossacarídeos, principalmente sacarose, aumentando o teor de carboidratos não fibrosos nos extratos obtidos, conseqüentemente, elevando a produção de acetil-CoA a partir da descarboxilação do piruvato, que é o processo que liga a via glicolítica para a produção de acetato e butirato, sendo esta a fonte primária de CO₂ no rúmen e também do H₂ (RUSSELL, 2002) que, por sua vez, são utilizados como substrato para a formação de metano, reduzindo o hidrogênio do meio e tornando o ambiente mais apropriado para o ecossistema microbiano.

A sacarose como substrato é utilizada especialmente por *Butyribrio* sp., que é o principal gênero na produção de butirato (STEWART et al., 1997; RUSSELL, 2002). Algumas cepas de *Butyribrio* precisam de acetato no meio para seu crescimento. Se o acetato não está disponível não haverá a formação de butirato. No entanto, algumas cepas possuem a butirato quinase, que não necessita de acetato para produzir butirato (RUSSELL, 2002). Logo, propõe-se que, havendo a redução de metanogênicas, tenha ocorrido excesso de CO₂ no meio, e ainda sugere-se permuta da rota de produção de metano para a produção de propionato como sumidouro de hidrogênio e alteração do perfil microbiano ruminal demonstrado por diferenças nos grupos avaliados.

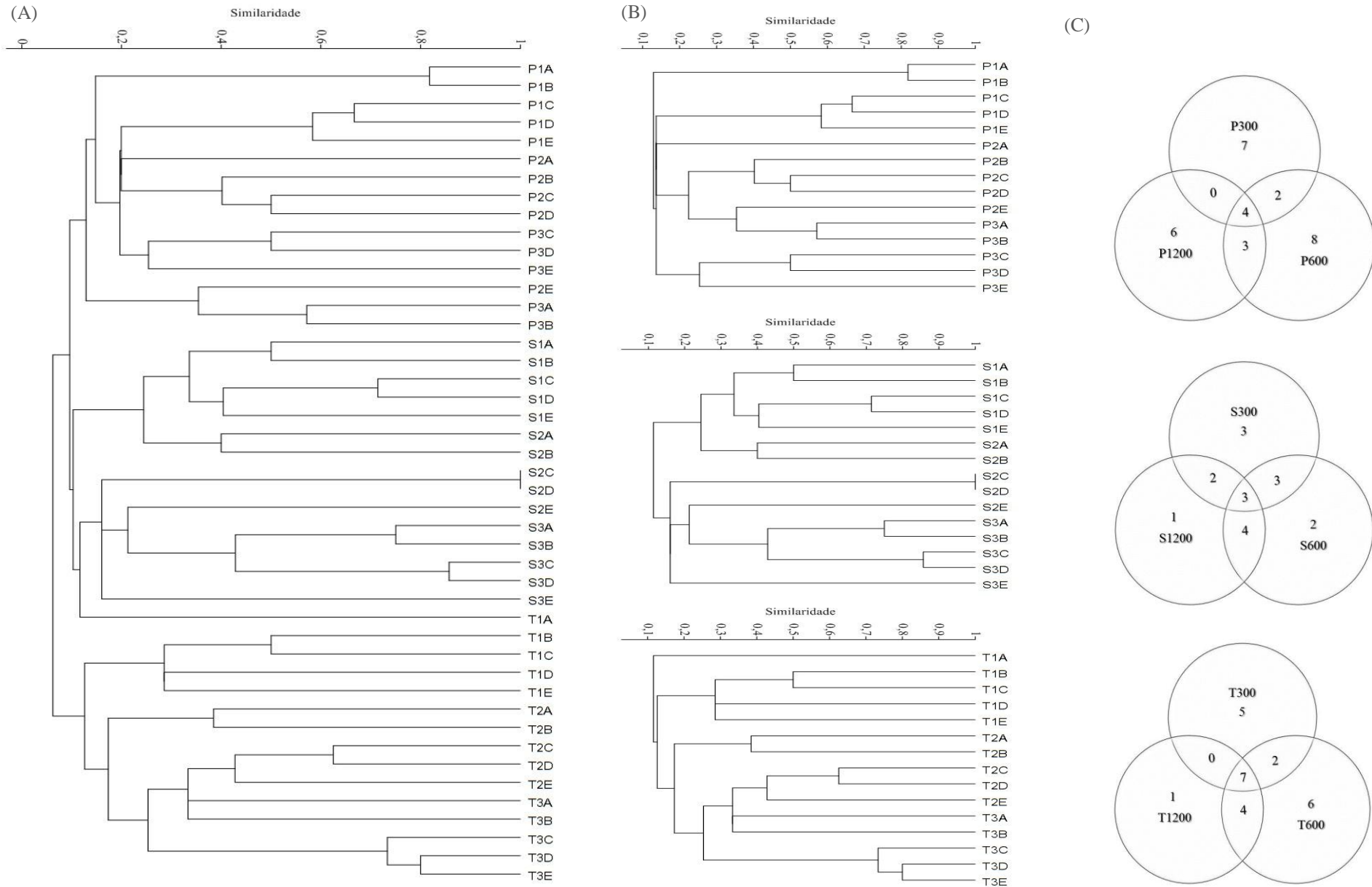


Figura 10 – Avaliação das comunidades microbianas das concentrações 300; 600 e 1200 mg/10 mL (1-3) dos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* (P); *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T), após diferentes tempos de incubação (A-E: 6, 12, 24, 36 e 96 h), determinados por análise de PCR-DGGE para bactérias. (A) Análise de agrupamento com base no perfil de bandas da DGGE gerados com UPGMA. (B) UPGMA por Extrato Etanólico. (C) Diagramas de Venn por Extrato Etanólico, números nos círculos e nas interseções indicam números de bandas compartilhadas e bandas específicas, respectivamente.

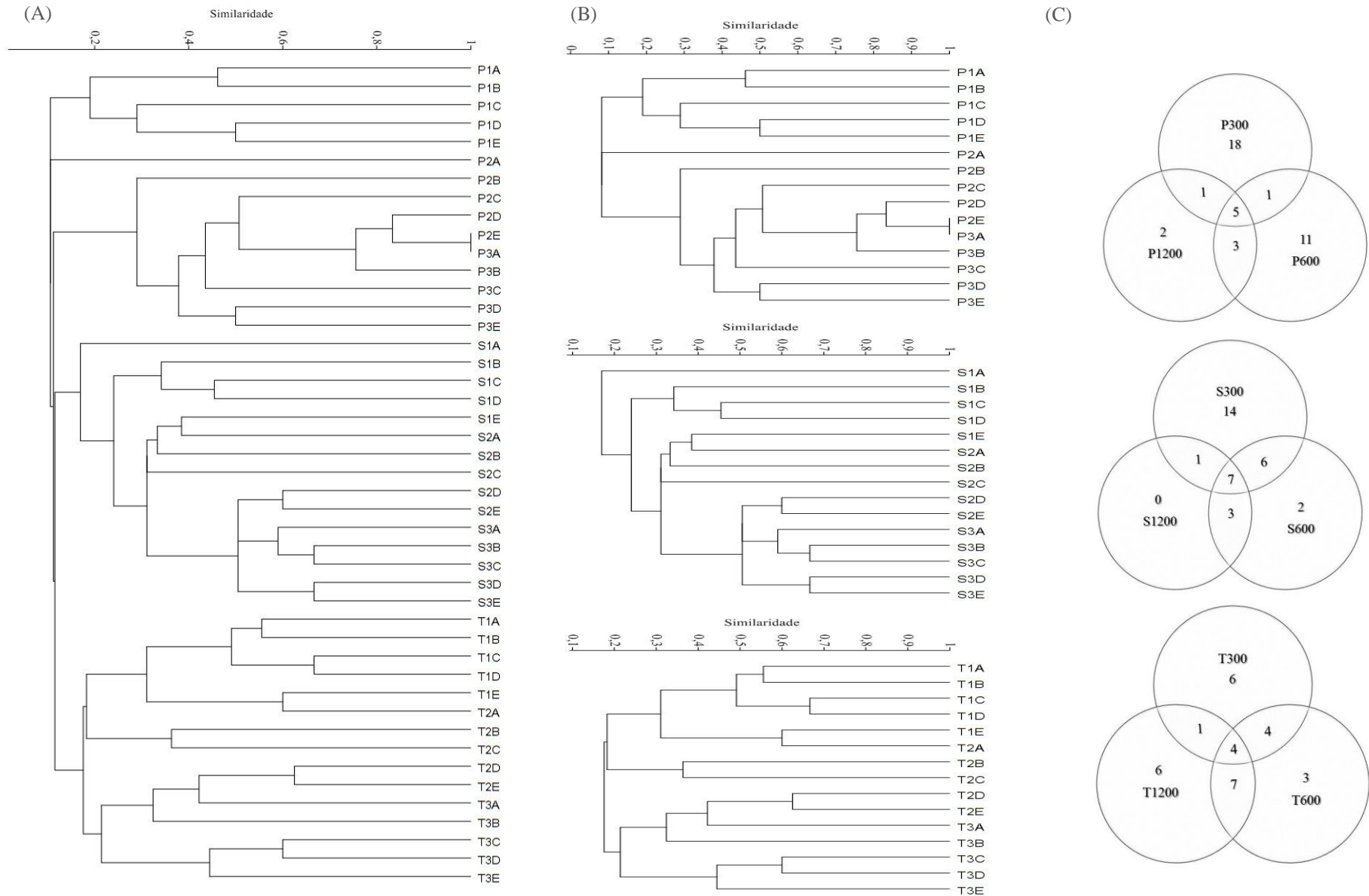


Figura 11 - Avaliação das comunidades microbianas das concentrações 300; 600 e 1200 mg/10 mL (1-3) dos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* (P); *Samanea saman* (S) e *Samanea tubulosa* (T), após diferentes tempos de incubação (A-E: 6, 12, 24, 36 e 96 h), determinados por análise de PCR-DGGE para arqueas. (A) Análise de agrupamento com base no perfil de bandas da DGGE gerados com UPGMA. (B) UPGMA por Extrato Etanólico. (C) Diagramas de Venn por Extrato Etanólico, números nos círculos e nas interseções indicam números de bandas compartilhadas e bandas específicas, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

O extrato bruto etanólico da vagem da leguminosa *Samanea tubulosa* apresenta efeito bioativo com potencial para utilização como aditivo em dietas para ruminantes, uma vez que aumenta a produção de biomassa microbiana com menor produção de gases, entretanto, há necessidade de estudos com animais.

A utilização dos extratos etanólicos dessas leguminosas tropicais podem alterar a população bacteriana e de arqueas no rúmen de bovinos, contribuindo para redução na metanogênese.

Para os experimentos posteriores de fermentação *in vitro*, sugere-se as concentrações de 1200, 300 e 100 mg/ 10 mL para os extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*, respectivamente.

5 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALAM, S.M.A.H.; BUENO, I.C.S.; TSAI, S.M.; FIGUEIRA, A.V.O. *In vitro* evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**. v.44, n.5, p.953-964. 2012.
- AHMAD, A.; KHURSEED, A.K.; SABIHA, Q.; VIQARUDDIN, A. Antifungal activity of some hydrosoluble *Prosopis juliflora* alkaloids. **Fitoterapia**. v.60, n.1, p.86-89. 1989.
- ALI, M.S.; AZHAR, I.; AHMAD, F.; AHMAD, V.U.; USMANGHANI, K. Antimicrobial screening of mimoaceous plants. **Pharmaceutical Biology**. v.39, n.1, p. 43-46. 2001.
- ALMEIDA; P.J.P.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, F.F.; SANTOS, A.B.; PEREIRA, T.C.J.; SANTOS, E.J.; MOREIRA, J.V. Santa Inês sheep supplementation on urochloa grass pasture during the dry season: intake, nutrient digestibility and performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.41, n.3, p.668-674. 2012.
- ANDERSON, R.C.; CALLAWAY, T.R.; VAN KESSEL, J.A.; JUNG, Y.S.; EDRINGTON, T.S.; NISBET, D.J. Effect of select nitro compounds on ruminal fermentation: An initial look at their potencial to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. **Bioresource Techenology**. v.90, p.59-63. 2003.
- AQEEL, A.; KHURSHEED, A.K.; VIQARUDDIN, A.; SABIHA, Q. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. **Arzneimittelforschung**. v.39, n.6, 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. Farelo 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.
- AZHAR, I.; MOHTASHEEMUL, H.; MAZHAR, F.; ALI, M.S. Some biological evaluations on *Samanea saman*. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.26, n.1, p.47-53. 2009.
- BABAYEMI, O.J.; BAMIKOLE, M.A.; DAODU, M.O. *In vitro* gas production and its prediction on metabolizable energy, organic matter digestibility and short chains fatty acids tropical seeds. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.8, n.7, p.1078-1082. 2009.
- BATISTA, A.M.; MUSTAFA, A.F.; McKINNON, J.J.; KERMASHA, S. In situ ruminal and intestinal nutrient digestibilities of mesquite (*Prosopis juliflora*) pods. **Animal Feed Science and Technology**. v.100, p.107-112. 2002.
- BATUGAL, P.A.; KANNIAH, J.; YOUNG, L.S.; OLIVER, J.T. (eds). Medicinal Plants Research in Asia, Volume 1: **The Framework and Project Workplans**. International Plant Genetic Resources Institute – Regional Office for Asia, the Pacific and Oceania (IPGRI-APO), Serdang, Selangor DE, Malaysia. 228 p. 2004.
- BHATTA, R.; VAITHIYANATHAN, S.; SINGH, N.P.; VERMA, D.L. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. **Small Ruminant Research**. v.67, p. 75-83. 2007.

- BLÜMMEL, M., MAKKAR, H.P.S., BECKER K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.77, p.24-34. 1997.
- BROUDISCOU, L.P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A.F. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of ruminal microbial biomass in a dual outflow fermenter. **Animal Feed Science and Technology**. v.101, p.183-189. 2002.
- BUNGLAVAN, S.J.; VALLI, C.; RAMACHANDRAN, M.; BALAKRISHNAN, V. Effect of supplementation of herbal extracts on methanogenesis in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**. v.22, n.11, 216. 2010.
- BUZO, J.; ÁVILA, R.; BRAVO, O. Efecto de la substitución progresiva de sorgo por vaina de mezquite em la alimentación de los borregos, **Técnica Pecuária em México**, México, DF, v.20, p. 23- 27. 1972.
- CARULLA, J.E.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A.; HESS, H.D. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.56, n.9, p.961-970. 2005.
- CECAVA, M.J.; MERCHEN, N.R.; BERGER, L.L. et al. Effect of energy level and feeding frequency on site of digestion and postruminal nutrient flows in steers. **Journal of Dairy Science**. v.73, p.2470-2479. 1990.
- ECKARD, R.J.; GRAINGER, C.; KLEIN, C.A.M. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. **Livestock Science**. v.130, n.1-3, p.47-56. 2010.
- GARCIA-GONZÁLEZ, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; GONZÁLEZ, J.S. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). **International Congress Series**. v.1293, p.172-175. 2006.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S. Tropical browses: contents of phenolic compounds, estimation of energetic value and stoichiometrical relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **Journal of Agricultural Science**. v.139, p.341-352. 2002.
- GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. **Journal of Applied Microbiology**. v.105, p.770-777. 2008.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, D.C.: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).
- GRAHAM, J.G.; PENDLAND, S.L.; PRAUSE, J.L.; DANZINGER, L.H.; SCHUNKE VIGO, J.; CABIESES, F.; FARNSWORTH, N.R. Antimycobacterial evaluation of peruvian plants. **Phytomedicine**. v.10, n.6-7, p.528-535. 2003.
- GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.62, p.279-290. 2003.
- HEGARTY, R.S.; BIRD, S.H.; VANSELOW, B.A. et al. Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. **British Journal of Nutrition**. v.100, p.1220-1227, 2008.

- HOOK, S.E.; NORTHWOOD, K.S.; WRIGHT, A.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, n.2, p.374-380. 2009.
- HOOK, S.E.; WRIGHT, A.D.G.; MCBRIDE, B.W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**. doi: 10.1155/2010/945785. 2010.
- HU, W.L.; LIU, J.X.; YE, J.A.; WU, Y.M.; GUO, Y.Q. Effects of ten saponin on rumen fermentation *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**. v.120, p.333-339. 2005.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**. v.37, p.547-579. 1901.
- JAYANEGARA, A.; GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Reduction in methane emissions from ruminants by plant secondary metabolites: effects of polyphenols and saponins. In: ODONGO, N.E.; GARCIA, M.; VILJOEN, G.J. (eds.). **Sustainable improvement of animal production and health**. Food and Agriculture Organization on United Nations, Rome. 2010. p.151-157.
- JOBLIN, K.N. Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. **Australian Journal of Agricultural Research**. v.50, p.1307-1313. 1999.
- KAITHO, R.J.; UMUNNA, N.N.; NSAHLAI, I.V.; TAMMINGA, S.; VAN BRUCHEM, J. Nitrogen in browse species: ruminal degradability and post-ruminal digestibility measured by mobile nylon bag and *in vitro* techniques. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.76, p.488-498. 1998.
- KAUSHIK, J.C.; SANJAY, A.; TRIPATHI, N.N. Antifungal properties of some plant extracts against the damping-off fungi of forest nurseries. **Indian Journal For**. v.25, n.3-4, p.359-361. 2002
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. Van. Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprint and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**. v. 17, p. 31-42. 2001.
- KUDO, Y.; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. **FEMS Microbiology Ecology**. v.22, p.39-48. 1997.
- LASSEY, K.R. Livestock methane emission: From the individual grazing animal through national inventories to the global methane cycle. **Agricultural and Forest Meteorology**. v.142, p.120-132. 2007.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. **SAS® system for mixed models**. Cary, 633p. 1996.
- LÓPEZ, S. CARRO, M.D.; GONZÁLEZ, J.S.; OVEGERO, F.J. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate degradation of hays in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**. v.73, p.99-113. 1998.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2.ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 352p. 1998.
- MAHGOUB, O.; KADIM, I. T.; JOHNSON, E. H.; SRIKANDAKUMAR, A.; AL-SAQRI, N.M.; AL-ABRI, A.S.; RITCHIE, A. The use of a concentrate containing Meskit (*Prosopis*

- juliflora*) pods and date palm by-products to replace commercial concentrate in diets of Omani sheep. **Animal Feed Science and Technology**. v.120, p.33-41. 2005a.
- MAHGOUB, O.; KADIM, I. T.; FORSBERG, N. E.; AL-AJMI, D.S.; AL-SAQRY, N.M.; AL-ABRI, A.S.; ANNAMALAI, K. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as a feed for goats. **Animal Feed Science and Technology**. v.121, p.319-327. 2005b.
- 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 Thecnology**. 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. **Journal Herb Pharmacother**. v.3, n.2, p.31-37. 2003.
- MCEWAN, N.R.; ABECIA, L.; REGENSBOGENOVA, M.; ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; NEWBOLD, C.J. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Letters in Applied Microbiology**. v.41, p. 97-101. 2005.
- MERTENS, D.R. Analysis of fiber in feeds and its use in feed evaluation and ration formulation. *In: Simpósio Internacional de Ruminantes, 1992, Lavras, MG. Anais...* Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1992. p.1-32.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.3, p.695-700. 1993.
- NAVEEN PRASAD, R.; VISWANATHAN, S.; RENUKA DEVI, J.; VIJAYASHREE NAYAK; SWETHA, V.C.; ARCHANA, B.R.; PARATHASARATHY,N.; RAJKUMAR, J. Preliminary phytochemical screening antimicrobial activity of *Samanea saman*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v.2, n.10, p.268-270. 2008.
- NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; MCINTOSH, F.M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal Animal Science**. v.73, p.1811–1818. 1995.
- NGAMSAENG, A.; WANAPAT, M.; KHAMPA, S. Evaluation of the local tropical plants by *in vitro* rumen fermentation and their effects on fermentation end-products. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.5, n.5, p.414-418. 2006.
- NOBRE, F.V. **Substituição do farelo de trigo (*triticum vulgare*) pelo fruto triturado da algarobeira (*Prosopis juliflora* (SW) DC) na alimentação de vacas em lactação**. 1981. 51p. Dissertação (Mestrado). Areia, PB: Universidade Federal a Paraíba, Centro de Ciências Agrárias.
- OLIVEIRA, C.A.S. **Farelo da vagem de algaroba em dietas para cabras em lactação**. 2009. 48p. Dissertação (Mestrado). Itapetinga, BA. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- ØRSKOV, E.R. **Nutrición proteica de los ruminantes**. Zaragoza: Acribia, 1988. 178p.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Fermentacion ruminal. *In: CHURCH, D.C. (ed.). El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición*. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap. 8, p.159-189.

- RUSSELL, J.B. **Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition**. James B. Russell, Ithaca, NY. 2002.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. The effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, p.1-6. 1989.
- 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.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G + C - rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of National Academy of Science**. v.86, n.1, p.232-236. 1989.
- SIGLER, W.V.; MINIACI, C.; ZEYER, J. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. **Journal of Microbiological Methods**. v.57, p.17-22. 2004.
- SIHORI, S.K.; GOEL, N.; PANDEY, P. Efficacy of diferente methanolic plant extracts on anti-methanogenesis, rumen fermentation and gas production kinetics *in vitro*. **Open Veterinary Journal**. v.2, p.72-77. 2012.
- SILVA, D.S. **Substituição progressiva do farelo de trigo pela vagem de algaroba na alimentação de bovinos em engorda**. 1981. 51p. Dissertação (Mestrado). Areia, PB: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias.
- SLIWINSKI, B.J.; SOLIVA, C.R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**. v.101, p.101-114. 2002.
- SOLIVA, C.R.; ZELEKE, A.B.; CLEMENT, C.; HESS, H.D.; FIEVEZ, V.; KREUZER, M. *In vitro* screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**. v.147, p.53-71. 2008.
- STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria. *In*: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. Chapman & Hall, London, pp.10-72.
- STROBEL, H.L.; RUSSELL, J.B. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**. v.69, n.11, p.2941-2947. 1986.
- TAVENDALE, M.H.; MEAGHER, L.P.; PACHECO, D.; WALKER, N.; ATTWOOD, G.T.; SIVAKUMARAN, S. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculans* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science Technology**. v.123-124, p.403-419. 2005.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B. A simple gas production method using a pressure transducer to determine fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**. v.48, p.185-197. 1994.

- UKOHA, P.O.; CEMALUK, E.A.C.; NNAMDI,O.L.; MADUS, E.P. Tannins and other phytochemical of the *Samanea saman* pods and their antimicrobial activities. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. v.5, n.8, p.237-244. 2011.
- UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. **Evaluating Ruminant Livestock Efficiency Projects and Programs**. *In*: Peer Review Draft. Washington, D.C, 2000, 48p.
- TOKURA, M.; CHANGAN,I.; USHIDA, K.; KOJIMA,Y. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. **Current Microbiology**. v.39, p.123-128.1999.
- TSAI, Y.; OLSON, B.H. Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from HumicSubstances in Sediments for Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2292-2295. 1992.
- YOKOYAMA, M.T.; JOHNSON, K.A. Microbiología del rumen e intestino. *In*: CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap.7, p. 137-157.

CAPÍTULO 2

EXPERIMENTO *in vitro* “EXTRATOS”

Efeito do Extrato Etanólico de Vagens de Leguminosas Tropicais sobre os Parâmetros Ruminais e Diversidade Bacteriana Ruminal

Effect of ethanol extract of Tropical Legume podson Ruminal Parameters and Ruminal Bacterial Diversity

RESUMO

ARGÔLO, L.S. **Efeito do Extrato Etanólico de Vagens de Leguminosas Tropicais sobre os Parâmetros Ruminais e Diversidade Bacteriana Ruminal.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Tese - Doutorado em Zootecnia - Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se avaliar a utilização de extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* sobre parâmetros ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e AGV) e sobre a diversidade bacteriana ruminal utilizando o método de fermentação *in vitro*. Foram realizadas determinações de teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), lignina, carboidratos totais (CT) e carboidratos não fibrosos (CNF) dos farelos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*, que foram percolados por etanol para obtenção dos extratos. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão à significância de 5% de probabilidade. Houve interação entre os extratos etanólicos e o tempo de incubação sobre o pH, cujos valores manteve-se em faixa adequada. Para a concentração de amônia ruminal, observou-se efeito da interação (extratos etanólicos x tempo de incubação). A utilização de farelo de trigo associado aos extratos de *P. juliflora*, *S. saman* e *S. tubulosa* reduziram a relação acetato:propionato no líquido ruminal. A diversidade genética bacteriana foi determinada por meio da DGGE dos produtos de PCR da região V3 do 16S rDNA, obtidos de *primers* universais para procariotos. O protocolo desenvolvido incluiu a otimização de: procedimentos na extração do DNA, amplificação pela PCR e otimização de preparação do gel de DGGE. Observaram-se variações nos padrões de bandas do gel, indicando alterações das populações estudadas em função dos tratamentos.

Palavras-chave: DGGE, parâmetros ruminais, PCR, *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa*.

*Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira, UESB; e Coorientadores: Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias, UESC; Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo, UESB; e Prof. Dr. Ronan Batista, UESB.

ABSTRACT

ARGÔLO, L.S. **Effect of ethanol extract of Tropical Legume podson Ruminal Parameters and Ruminal Bacterial Diversity.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Thesis – Doctor Degree in Animal Science – Production of Ruminant).*

The objective was to evaluate the use of ethanol extracts of *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* and *Samanea tubulosa* on ruminal parameters (pH, ammonia concentration and VFA) and the rumen bacterial diversity using the method of fermentation in vitro. Determinations were carried out in dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), ether extract (EE), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) detergent insoluble nitrogen neutral (NDIN), acid detergent insoluble nitrogen (ADIN), lignin, total carbohydrates (TC) and non-fiber carbohydrates (NFC) of *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* and *Samanea tubulosa* brans were percolated with ethanol to obtain the extracts. The experimental design was completely randomized. The data were subjected to analysis of variance and regression significance of 5% probability. The average pH values were 6.95, 6.21, 6.35 and 7.09 for treatments that were incubated in wheat bran associated with DMSO and ethanol extracts of *P. juliflora*, *S. saman* and *S. tubulosa*, respectively, these values are maintained in proper range. For ruminal ammonia concentration was observed interaction effect (time vs ethanol extracts of incubation). The use of wheat bran associated with extracts of *P. juliflora*, *S. saman* and *S. tubulosa* reduced the acetate:propionate ratio in rumen fluid. The diversity of bacterial gene was determined by DGGE of PCR products of the V3 region of the 16S rDNA universal primers obtained from prokaryotes. The protocol developed included the optimization: procedures in DNA extraction, PCR amplification and optimization of preparation of the DGGE gel. A variation in the pattern of bands from the gel, indicating changes in the population studied in function of the treatment.

Keywords: DGGE, PCR, *Prosopis juliflora*, ruminal metabolism, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa*.

* Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, *D. Sc.*, UESB; and Co-advisers: João Carlos Teixeira Dias, *D. Sc.*, UESC; Mauro Pereira de Figueiredo *D. Sc.*, UESB; and Ronan Batista, *PhD.*, UESB.

1 INTRODUÇÃO

A fermentação ruminal é caracterizada quantitativamente pelas concentrações e proporções relativas dos produtos gerados pela fermentação. A digestão de carboidratos estruturais é realizada especialmente por bactérias celulolíticas que, além de degradarem celulose, formando o acetato, também fornecem substrato para arqueas metanogênicas que utilizam H_2 e CO_2 para a formação de metano. As bactérias amilolíticas degradam, principalmente, amido formando o propionato, que é o principal precursor gliconeogênico nos ruminantes. Existem ainda bactérias que hidrolisam lipídeos, bem como as proteolíticas que fornecem a principal fonte de nitrogênio para as bactérias celulolíticas, o nitrogênio em forma de amônia e ácidos graxos voláteis de cadeia ramificada (RUSSELL, 2002).

Em síntese, os microrganismos ruminais degradam carboidratos estruturais e não-estruturais e proteínas até ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato) e amônia, os quais serão utilizados pelos ruminantes em várias rotas metabólicas, ou estes nutrientes serão fermentados pelos microrganismos com vistas a utilizarem os compostos carbônicos intermediários, mais amônia para a síntese de aminoácidos ou energia, para a multiplicação da massa microbiana. Esta será utilizada pelo animal como seu principal suprimento de proteína (VAN SOEST, 1994).

Por esse motivo, é indispensável conhecer as interações entre os microrganismos, seus produtos metabólicos (AGV) e o hospedeiro, para que se possa maximizar a produção dos ácidos graxos benéficos (acetato, propionato e butirato) ao animal e minimizar a produção de produtos em que há perdas de nitrogênio e de energia, como o nitrogênio amoniacal e metano. A produção de acetato pelas bactérias celulolíticas gera quantidades significativas de H_2 que, juntamente com o CO_2 (que se localiza no meio), é utilizado por arqueas metanogênicas para a formação de metano. Devido a isso, procura-se diminuir a razão acetato:propionato no rúmen do animal.

Os extratos de plantas leguminosas apresentam potencialidades de serem explorados como agentes manipuladores do rúmen. Leguminosas forrageiras como *Prosopis juliflora* e *Samanea saman* têm sido bastante estudadas sobre suas propriedades antimicrobianas, atribuídas à presença de fatores antinutricionais como taninos, alcaloides, terpenos, saponinas e glicosídeos (TABOSA et al., 2000; SAWAL et al., 2004; AZHAR et al., 2009; UKOHA et al., 2011). Estudos com estas leguminosas têm se concentrado na avaliação do seu potencial nutritivo.

Os efeitos da manipulação das atividades e números das populações de bactérias, protozoários, fungos e arqueas são variados e, muitas vezes, contraditórios, pois existem diferenças nos extratos de plantas utilizadas (a concentração e natureza do ingrediente ativo

pode variar mesmo dentro das mesmas espécies cultivadas em locais diferentes e ainda mais amplamente entre espécies de plantas, mesmo intimamente relacionada) (HART et al., 2008). Com o avanço das técnicas de perfis moleculares, inicia-se uma melhor descrição das alterações nas populações microbianas do rúmen, quando extratos vegetais são fornecidos.

Objetivou-se avaliar a utilização de extratos etanólicos de farelos de vagens de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* sobre parâmetros ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis) e sobre a diversidade bacteriana ruminal, utilizando o método de fermentação *in vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EE)

As vagens de *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* foram adquiridas no município de Itapetinga-Bahia-Brasil e as vagens de *Prosopis juliflora* foram obtidas no município de Brumado-Bahia-Brasil. Uma excisata de cada um desse material encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia-Brasil.

Os farelos das vagens das leguminosas foram produzidos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-Bahia-Brasil. As vagens coletadas foram secas ao sol durante três dias. Em seguida, foram processadas em um triturador e moídas com peneira de 2 mm para obtenção do farelo. Após a moagem, as amostras foram destinadas à estufa de ventilação forçada, por 72 horas, a $60 \pm 5^\circ\text{C}$, em seguida, foram trituradas novamente em moinho tipo facas, com peneira de malha de 1 mm e, finalmente, acondicionadas individualmente em recipientes plásticos, para posteriores análises. As composições químicas dos farelos utilizados para a obtenção dos extratos etanólicos, bem como do farelo de trigo, encontram-se na Tabela 1.

Aproximadamente 2 kg de cada farelo foram submetidos à extração por percolação com etanol a 95%, em seguida, este percolado foi concentrado a vácuo a uma temperatura em torno de 50°C até secura, em evaporador rotatório, obtendo, assim, os extratos etanólicos brutos (222g, 230,2g, 381,6g para farelo da vagem de *P. juliflora*, de *S. saman* e de *S. tubulosa*, respectivamente). O aspecto desses extratos era viscoso de coloração castanho-escuro.

Tabela 1 – Composição química (% matéria seca) dos farelos de vagem de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa* e de farelo de trigo.

Item	<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Samanea saman</i>	<i>Samanea tubulosa</i>	Farelo de Trigo
Matéria Seca	92,2	85,8	90,9	89,8
Matéria Mineral	3,8	4,0	3,6	7,1
Matéria Orgânica	95,8	96,0	96,4	83,9
Proteína Bruta	7,2	17,7	12,4	17,4
Fibra Detergente Neutro	26,7	32,2	44,4	51,1
Fibra Detergente Ácido	23,5	24,9	37,4	7,1
Carboidratos Totais	87,4	77,9	83,9	73,1
Carboidratos Não Fibrosos	60,7	45,7	39,5	22,0
Hemicelulose	3,4	7,3	7,0	44,0
Celulose	18,6	12,6	13,3	3,5
Lignina	4,9	12,3	24,1	3,6
NIDA ¹	0,1	0,2	0,4	--
NIDN ²	0,2	0,3	0,3	--
Extrato Etéreo	1,6	0,4	0,1	2,4
Tanino ³	0,45	17,58	145,06	nd ⁴

¹nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), ²nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), ³valores expressos em equivalente-grama de leucocianidina/ kg de matéria seca, ⁴não detectado.

2.2 Ensaio *in vitro*

As fermentações *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista-Bahia-Brasil e consistiram na incubação dos extratos etanólicos brutos, obtidos do farelo de vagens de *P. juliflora* (P), *S. saman* (S) e *S. tubulosa* (T), sobre os parâmetros ruminais pela microbiota ruminal em inóculo de bovinos fistulados, em estufa sob temperatura constante (39°C), tendo o farelo de trigo como substrato.

Para este ensaio, utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado, tendo como tratamentos a adição de 10 mL de uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO; 1% v/v) como controle e as soluções dos extratos etanólicos brutos diluídos em água, utilizando como solvente o DMSO, perfazendo 1% do volume total da solução, a uma concentração de 1200 mg/ 10 mL. Realizaram-se três rodadas de incubação, com três repetições por tratamento.

A cada frasco de 160 mL foi adicionado 80 mL de solução tamponante, contendo micro e macrominerais e tamponantes (THEODOROU et al., 1994), saturados com CO₂, 1 g de farelo de trigo (1 mm), 10 mL de cada extrato etanólico diluído em DMSO e 10 mL do inóculo, além destes foram incluídos 3 frascos contendo meio nutriente, 10 mL de DMSO (1%) e fluido ruminal como controle.

O meio nutriente foi feito misturando uma Solução-tampão (200 mL), que continha NH₄HCO₃ (4,5 g/L) e NaHCO₃ (39,4g/L) misturados com água destilada (500 mL), solução de macrominerais (200mL; Na₂HPO₄.12H₂O, 10,6g/L; KH₂PO₄, 7,0g/L; MgSO₄.7H₂O, 0,7 g/L), solução micromineral (0,1 mL; CaCl₂.2H₂O, 148,5g/L; MnCl₂.4H₂O, 112,5g/L; CoCl₂.6H₂O, 11,3g/L; FeCl₃.6H₂O, 90,0g/L), solução de meio B (60 mL; cisteína HCl, 7,0 g/L; Na₂S.9H₂O, 7,0g/L; NaOH, 1,8 g/mL) e solução de resazurina (1,0 mL; 0,01 g/L).

2.3 Coleta e Preparo do Inóculo

O fluido ruminal utilizado nas inoculações foi composto por uma mistura de fluidos de três vacas fistuladas cirurgicamente no rúmen, mantidas em confinamento, cuja dieta era exclusiva de volumoso (*Brachiaria* spp.).

As vacas foram mantidas em jejum hídrico e alimentar nas 12 horas que antecederam a coleta do fluido ruminal. Após a coleta, estes foram armazenados em garrafas térmicas para o transporte até o laboratório, onde foram filtrados em tecido de nylon com porosidade de 100 micras, misturados nas mesmas proporções e saturados com CO₂, mantidos em banho-maria a 39°C.

O fluido ruminal (10 mL) foi inoculado nos frascos contendo as amostras e meio de cultura, vedados com tampa de borracha expansiva e mantidos em estufa a 39°C até o momento

das coletas para avaliação dos parâmetros fermentativos. A mistura de fermentação atingiu um volume final de 100 mL.

2.4 Parâmetros de fermentação (Concentração hidrogeniônica, nitrogênio amoniacal, ácidos graxos voláteis)

Amostras do líquido ruminal dos frascos de incubação foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 36 horas de incubação para mensuração do pH e determinação de nitrogênio amoniacal e ácidos graxos voláteis (AGV). O pH foi medido imediatamente após a coleta, por meio de potenciômetro digital, no conteúdo dos frascos a cada tempo, antes da filtração das amostras.

Para determinação da concentração de amônia (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV), as amostras foram acidificadas com ácido sulfúrico 20% e ácido fosfórico 25%, respectivamente, imediatamente após a coleta (1 mL de ácido: 10 mL fluido) e, em seguida, congeladas.

Ao final do experimento, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 5000 rpm (rotação por minuto), durante 10 minutos, e retirada 2 mL do sobrenadante para determinar a concentração de N-NH₃, obtida após destilação com 5 mL de KOH 2N, conforme técnica modificada de Vieira (1980) (Anexo E).

Nas amostras destinadas à determinação de AGV, foi realizada a filtração e adição de 1mL de ácido metafosfórico para cada 10mL do filtrado e foram imediatamente armazenadas a 20°C negativos. No Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Santa Cruz, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 800 x g por 15 minutos. A determinação e a quantificação de ácidos graxos voláteis foram realizadas por cromatografia gasosa (GC), segundo método preconizado por Erwin et al. (1961). Para tal, foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo GC-2010 da Shimadzu Corporation, equipado com coluna Rtx-Wax 30m x 0,25mm x 0,25mm. As temperaturas utilizadas para operação do injetor, coluna de separação e detector de ionização de chamas foram de 210, 90 a 170 e 230°C, respectivamente. Foram preparadas soluções na concentração de 20 mM dos ácidos acético, propiônico e butírico de forma a produzir uma solução padrão de AGV de concentração conhecida. Para cada determinação, foram injetados 1,0 µL de amostra, sendo o resultado obtido através de um integrador que utilizou a solução padrão como base para o cálculo das concentrações de AGV da amostra.

2.5 Extração de DNA, Amplificação por PCR e Análise de DGGE

Nos Laboratórios de Monitoramento Ambiental e Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus-Bahia-Brasil), o DNA microbiano total foi extraído do conteúdo ruminal dos frascos de incubação, coletado nos tempos 6, 12, 24, 36 e 96 horas de incubação e imediatamente armazenados em congelador a -20°C. Posteriormente, essas

amostras foram descongeladas e submetidas a um processo de lavagem com PBS 1x (Solução Salina Tamponada). Foi adicionado ao *pellet*, 600 µL de TESC (10 M Tris-base, 1 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,3) juntamente com 30 µL de Tween 80 (Merck) e homogeneizado. A amostra foi submetida ao banho ultrassônico Magiclean 1600 (Unique®) por 2 minutos, para que houvesse desfloculação das partículas bacterianas, que possivelmente poderiam estar aderidas à matéria orgânica.

Após o banho ultrassônico, as amostras foram novamente centrifugadas por 3 minutos a 50 x g e coletou-se o sobrenadante que, por sua vez, foi centrifugado a 7 000 x g por 5 minutos. Dessa vez, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensão em 700 µL de Tampão de Lise (50mM:50mM:500mM), 12 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹) (Promega) e 12 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) e adicionados às amostras, homogeneizando pela inversão dos tubos. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 65°C, por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos.

A lise física das células bacterianas foi realizada por meio de choque térmico, em três ciclos, 10 minutos em ultra *freezer* (80°C negativos) e 5 minutos em banho-maria a uma temperatura de 80°C. Um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, e a mistura foi gentilmente homogeneizada. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1 800 x g e a fase aquosa foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,7 volume de isopropanol gelado (J.T. Barker) e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. A solução foi misturada suavemente (5-10 vezes) e mantido a 20°C negativos por 16 h. Foi obtido o *pellet* das amostras por centrifugação durante 5 minutos a 10 000 x g, o *pellet* foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspensão em 50-100 µL de TE clássico (10 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0).

Quando necessário, o DNA extraído foi purificado em mini colunas empacotadas com matriz de gel Sephadex G-200, equilibradas com TE clássico, segundo Tsai e Olson (1992). Um volume de 250 µL do eluente foi adicionado às colunas juntamente com o DNA de cada amostra e, posteriormente, incubadas em banho-maria (50-60°C) por 10 minutos, sendo, em seguida, centrifugadas por 2 minutos a 1 800 x g.

As análises da diversidade microbiana foram efetuadas através de reação em cadeia da polimerização (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Na amplificação dos fragmentos do DNA, foi utilizado o set de *primers* 357F (5' - CAC GGG GTA CGG GAG GCA GCA G - 3'), junto com o GC *clamp* (5' - CGC CCG CCG CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG - 3') e 518R (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Integrated DNA Technologies, Inc.) (MUYZER et al., 1993; MCEWAN et al., 2005). A região variável V3 de 16S rDNA foi utilizada por ser uma região conservada de bactérias comumente encontradas no trato gastrointestinal e amplificam aproximadamente 200 bp do gene bacteriano. A utilização do grampo de GC, acoplado a um dos iniciadores, impede a completa separação

das fitas do DNA, aumentando a sensibilidade da Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) (SHEFFIELD et al., 1989).

A mistura para reação da PCR (25 µL) para o Domínio *Bacteria* consistiu de: 17,65 µL de Água Milli-Q estéril, 1 x do Tampão da *Taq* polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador (357F com grampo de GC e 518R), 200 µM de cada um dos dNTP e 0,5 U da Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (c. 20 ng) em um volume final de 25 µL. A amplificação foi obtida seguindo o programa: desnaturação a 95°C, por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 60s, 55°C por 60s, 72°C por 60s, e a PCR foi finalizada pela extensão a 72°C por 30 minutos. As reações foram analisadas em gel de agarose a 2% (m/v), corado com brometo de etídio, com transiluminador de luz ultravioleta (KODAK).

A DGGE foi realizada utilizando o Sistema para Análise de Mutações CDC 20 x 20 cm (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), sendo 20 µL dos produtos de PCR colocados em gel de poliacrilamida a 8% em 0,5 mmol L⁻¹ com gradiente desnaturante de 25% a 55% em tampão 1x Tris-Acetato-EDTA em uma corrida a voltagem de 85 V por 30 minutos e, em seguida, de 200 V por 4 h a 60°C. As bandas de DNA foram visualizadas por coloração com prata.

2.6 Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do programa Statistical Analyses System – SAS (SAS, 2006).

A análise de variância da produção de gases utilizado foi o Proc MIXED do SAS (LITTEL et al., 2006). O modelo estatístico de regressão linear múltipla com duas variáveis independentes (ou seja, os extratos etanólicos na concentração 1200 mg/10 mL e tempo de incubação) e repetições por tratamento foi:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 Tr + \beta_2 Tr^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 TrxT + \varepsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado de Y, resposta variável nos níveis Tr e T, na repetição k; β_n é o coeficiente de regressão associado com o fator de interesse (X_{1i} , X_{1i}^2 , X_{2j} , X_{2j}^2 , $X_{1i}X_{2j}$); X_{1i} é o valor do nível X_{1i} do X_1 , variável independente; X_{2j} é o valor do nível de X_{2j} do X_2 , variável independente; ε_{ijk} é o efeito do resíduo da regressão associado com cada Y_{ijk} valor observado, sendo $\varepsilon \sim NID(0, \sigma_\varepsilon^2)$. Em um delineamento inteiramente casualizado, $\varepsilon_{ijk} = \varepsilon_{ijk} + f_{aij}$, em que $f_{aij} = \mu_{Yij} - \hat{Y}_{ij}$, em que f_{aij} é a falta de ajuste do modelo para o Y_{ij} ponto.

A análise dos dados foi pelo procedimento MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). Os efeitos dos tratamentos e os tempos foram decompostos em contrastes polinomiais lineares a 4º grau. Além disso, a interação dos tratamentos ao longo do tempo foi examinada, usando a opção de fatia de MIXED e contrastes. A configuração mais baixa da informação Akaike critério (AIC) foi obtida utilizando o componente de variância (VC):

$$Y_{ijk} = \mu + Tr_i + T_j + Tr_i T_j + \varepsilon_{ijk}; NID(0; \sigma^2)$$

Em que: Tr = nível de substituição(1200 mg/10 mL) e T = tempo (6; 12; 24; 36; 96 h).

Para escolher a melhor equação, os fatores Tr e T e as interações não significativas em $P < 0,05$ foram retiradas do modelo. Os contrastes da interação foram utilizados para comparar o efeito dos níveis de extratos e interações ao longo do tempo em pH, N-NH₃, AGV.

Três métodos de análise multivariada foram aplicados aos resultados: 1. Análise de agrupamento em *cluster*; 2. A análise de agrupamento precedido pela principal análise de componentes (PCA); 3. Diagrama de Venn.

No primeiro método, análise de agrupamento, a partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das repetições, em cada coleta, para identificar a presença ou não de bandas, codificadas por 1 e 0, respectivamente (KOZDRÓJ e ELSAS, 2001). A partir dessa matriz de dados, foi feita a análise de agrupamento por dendograma, para a qual foi utilizado para o cálculo da similaridade entre os indivíduos e pelo método de agrupamento UPGMA (método das médias das distâncias) com o coeficiente de Jaccard (1901). No segundo método, PCA, foi aplicado para reduzir a dimensão das variáveis originais. No terceiro método, os diagramas de Venn foram construídos manualmente, tendo em conta as intersecções, obtidas das bandas DGGE.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos etanólicos de leguminosas têm potencial como manipulador da fermentação ruminal. Sobre o pH ruminal, observou-se influência da interação dos extratos etanólicos vs tempo de incubação ($P < 0,0001$), como apresentado na Figura 1. Quando submetida à análise de regressão, verificou-se que, para os tratamentos em que foi incubado o farelo de trigo, associado ao extrato etanólico de *Samanea saman* e de *Samanea tubulosa*, verificou-se equação cúbica e quadrática, respectivamente (Figura 1), considerando o ponto de mínimo de 5,88 em 24,1 h após a incubação com extrato etanólico de *S. saman*. Já para o farelo de trigo incubado com extrato de *S. tubulosa*, observou-se regressão quadrática com ponto de mínimo estimado de 5,23 após aproximadamente 65 h de incubação.

Os valores encontrados localizam-se dentro do limite ideal para proporcionar a digestão da fibra. Experimentos têm comprovado que a efetividade do crescimento das bactérias predominantes no rúmen se altera consideravelmente com o pH. As bactérias celulolíticas são afetadas intensamente, uma vez que o pH do rúmen decresce para abaixo de 6,0 (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988). Quando o pH decresce, ocorre o favorecimento de bactérias amilolíticas e resistentes, a acidez aumenta, enquanto microrganismos celulolíticos diminuem, assim, a atividade relativa da amilase em relação à celulase aumenta, isso explica a relação inversa entre biomassa e degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS) (LÓPEZ et al., 1998), observada com a adição dos extratos etanólicos, já que microrganismos amilolíticos apresentam maior taxa de crescimento quando comparados com os fibrolíticos. Essa inversão, possivelmente, corresponde à fermentação da fração de digestão rápida, que é a principal fonte de energia para os microrganismos ruminais, sustentando seu crescimento inicial.

Alguns trabalhos avaliando aditivos fitogênicos (BODAS et al., 2008) e extrato metanólico de leguminosa observaram que não houve efeito dos tratamentos sobre o pH ruminal (BUNGLAVAN et al., 2010).

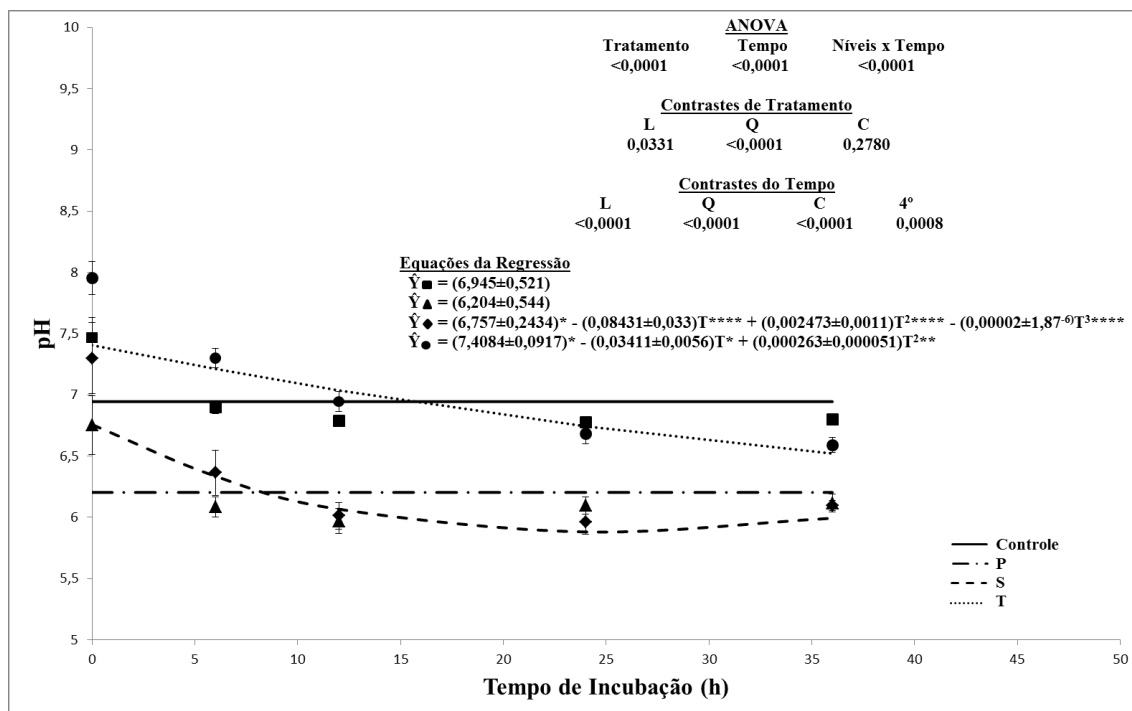


Figura 1 – pH ruminal em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao: DMSO (Controle); extrato etanólico de *P. juliflora* (P); extrato etanólico de *S. saman* (S); extrato etanólico de *S. tubulosa* (T).

*significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; *** significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; **** significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

Houve efeito da interação (extratos etanólicos vs tempo de incubação) sobre a concentração de amônia ruminal. As concentrações de amônia ruminal (Figura 2), em função do período de incubação, apresentou comportamento linear crescente para o farelo de trigo em associação ao DMSO (controle), corroborando com Simko et al. (2010), que avaliou o farelo de trigo sobre a fermentação ruminal de bovinos fistulados. Por outro lado, houve um comportamento quadrático com mínimos estimados de 11,96 mmol/ L, 14h após incubação, e de 4,46 mmol/ L, 20h após a incubação, para o farelo de trigo em associação aos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* e *S. saman* e com ponto de máximo de 17,38 mmol/ L, estimado 12h após incubação para o farelo de trigo associado ao extrato de *S. tubulosa*.

Muitos autores defendem a existência de concentrações mínimas de N-NH₃ para que não limite a fermentação e a adequada degradação da fibra seja capaz de garantir a manutenção das funções normais do rúmen. Não existe, porém, consenso sobre um valor comum, possuindo grande variação entre os distintos autores, Satter e Slyter (1974), os quais sugeriram entre 2 e 5 mg/ 100 mL de líquido ruminal, enquanto Mehrez et al. (1977) recomendaram de 19 a 23 mg/ 100 mL e Preston e Leng (1987), em torno de 20 mg/ 100 mL.

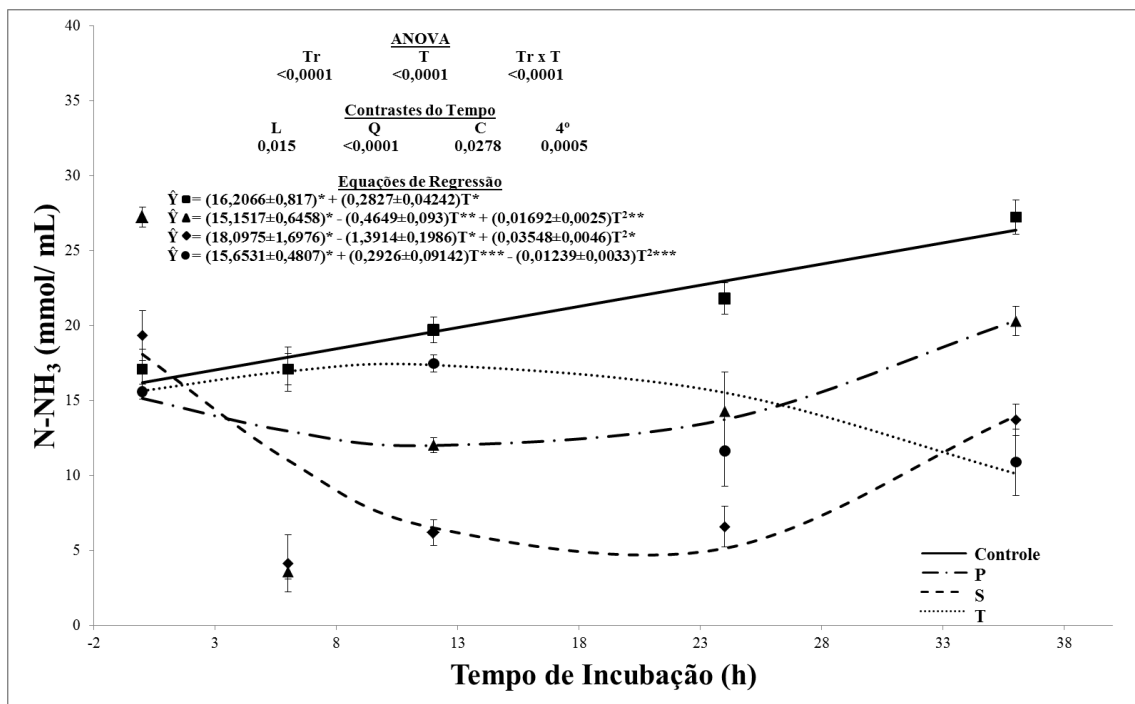


Figura 2 – Concentrações de nitrogênio amoniacal em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao: DMSO (Controle); extrato etanólico de *P. juliflora* (P); extrato etanólico de *S. saman* (S); extrato etanólico de *S. tubulosa* (T).

*significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; *** significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; ****significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

As concentrações relativas de acetato em mM encontram-se na Figura 3A, e indicam que houve interação (extratos etanólicos vs tempo de incubação) sobre essa variável, verificando efeito cúbico do tempo para os tratamentos que continham farelo de trigo incubado com DMSO (controle) e com extrato etanólico de *P. juliflora* e efeito linear crescente para o tratamento com extrato de *S. tubulosa*. Este ácido é sempre produzido em maior quantidade que os outros AGV do rúmen independente da espécie vegetal utilizada na dieta. Para a produção de acetato, são estimuladas, especialmente, as bactérias celulolíticas e sacarolíticas, que são responsáveis pela intensa digestão da celulose e pela fermentação dos carboidratos solúveis (OWENS e GOETSCH, 1988).

Ao contrário, com dietas ricas em amido, a população bacteriana é principalmente amilolítica. Os microrganismos amilolíticos competem pelos carboidratos solúveis e pelos produtos da hidrólise do amido e da hemicelulose, especialmente com um pH mais baixo, e produzem maiores quantidades de propionato (OWENS e GOETSCH, 1988). No entanto, pouco se sabe sobre a composição química das espécies estudadas. Sobre a *P. juliflora*, sabe-se que possui 11 a 17% de amido e que este não é seu principal componente energético, mas sim os mono e oligossacarídeos, 28%. O farelo de trigo incubado, juntamente com o DMSO e os

extratos etanólicos, aumentaram, individualmente, a concentração de propionato em função do tempo de incubação, sendo o aumento mais evidente nos tratamentos em que continham extrato de *P. juliflora* e *S. saman* (Figura 3B).

Para o butirato, também houve diferenças significativas na interação (extratos etanólicos vs tempo de incubação), apresentando efeito linear em função do tempo, embora as equações de análise de regressão não foram significativas para os tratamentos contendo farelo de trigo associado ao DMSO e ao extrato etanólico de *S. tubulosa* (Figura 3C). Na literatura tem sido comentada a elevada participação de leguminosas, apesar de não existirem grandes diferenças entre os valores de acetato, há uma tendência a ocorrer um aumento na concentração de butirato com sua inclusão. A alta produção ruminal de butirato, no entanto, parece ser indesejável do ponto de vista de integridade e atividade metabólica da parede ruminal, em razão dos efeitos diretos indesejáveis desse ácido sobre a proliferação e a queratinização das células epiteliais (GÁLFI et al., 1993).

Houve efeito significativo do tempo de incubação sobre a relação acetato:propionato, apresentando, por meio da análise de variância, efeito linear decrescente para o tratamento controle e efeito cúbico para os demais tratamentos (Figura 3D).

Ngamsaeng et al. (2006) relataram que houve diferenças nas concentrações de AGV, quando comparou diversas plantas tropicais, e observou um aumento do propionato e redução da relação acetato:propionato para aquelas plantas com maiores taxas de taninos condensados, esta mesma condição foi observada por Bhatta et al. (2009). A respeito de taninos, têm sido relatado seus efeitos sobre as proporções molares de AGV e observado conjuntamente uma redução na população de protozoários e um aumento na população bacteriana; sabe-se, ainda, que acetato e butirato também são produtos finais da fermentação realizada por protozoários (JOUANY, 1994; GETACHEW e MAKKAR, 2002). Bodas et al. (2008), avaliando aditivos fitogênicos, não observaram qualquer modificação substancial sobre os parâmetros fermentativos. Corroborando com esta informação, Sliwinski et al. (2002) observaram que, utilizando extratos vegetais, não houve efeito sobre a concentração de AGV total.

A proporção molar dos diferentes AGV depende da composição da dieta e da relação forragem:concentrado que, conseqüentemente, influenciam os microrganismos ruminais e o padrão de fermentação. Apesar de variações da população microbiana e de diferenças na ingestão, a proporção ruminal varia muito pouco por razões molares (moles de acetato: propionato: butirato), geralmente, sendo próxima a 65: 25: 10, para dietas com altas proporções de forragem, e 50: 40: 10, para dietas com altas proporções de concentrado, dependendo do pH (OWENS e GOESTSCH, 1993). Neste estudo, a proporção dos AGV encontrada foi, em média, avaliando apenas os tratamentos que receberam os extratos etanólicos, 49: 17: 34, revelando o padrão de fermentação para produção de butirato (Figura 4).

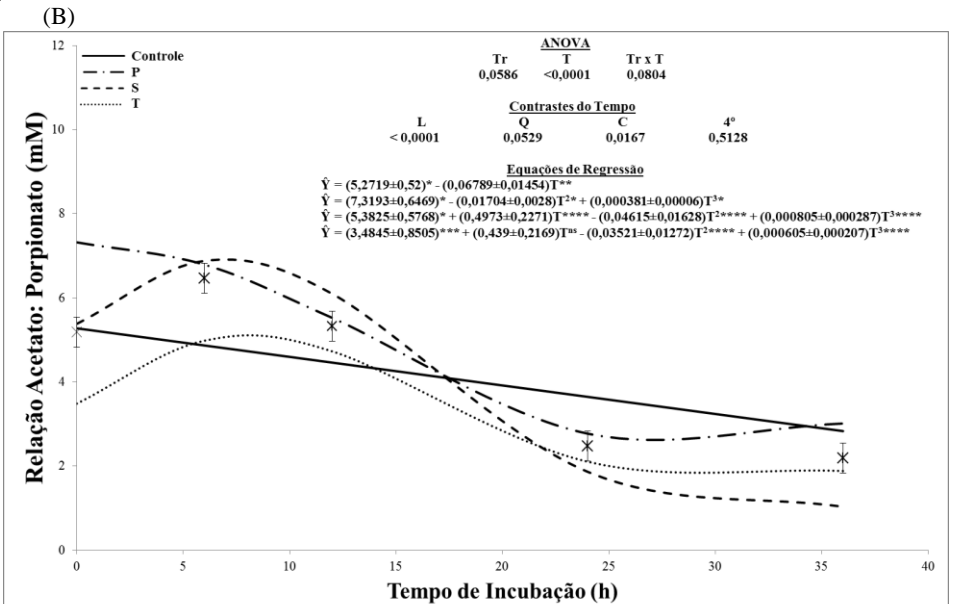
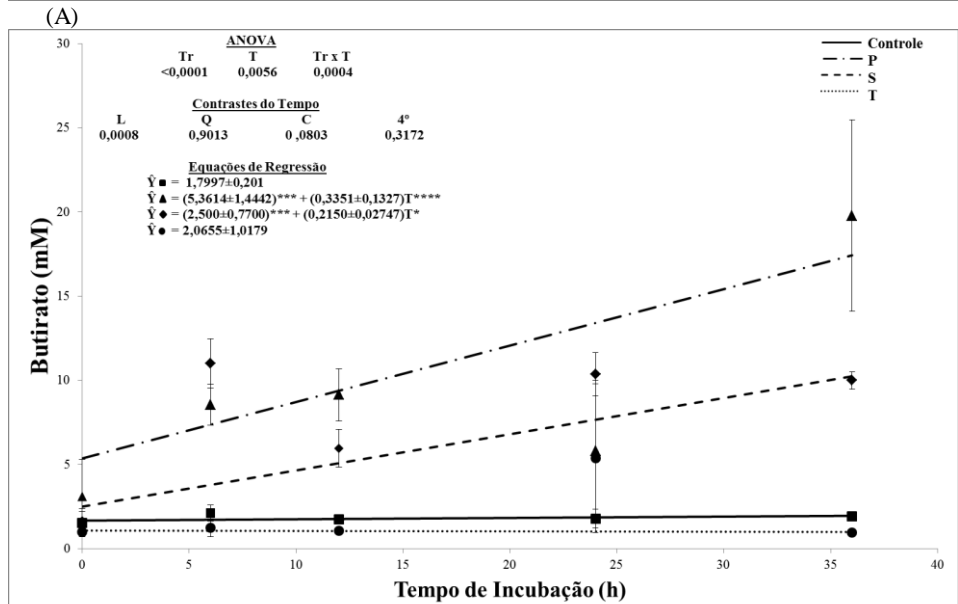
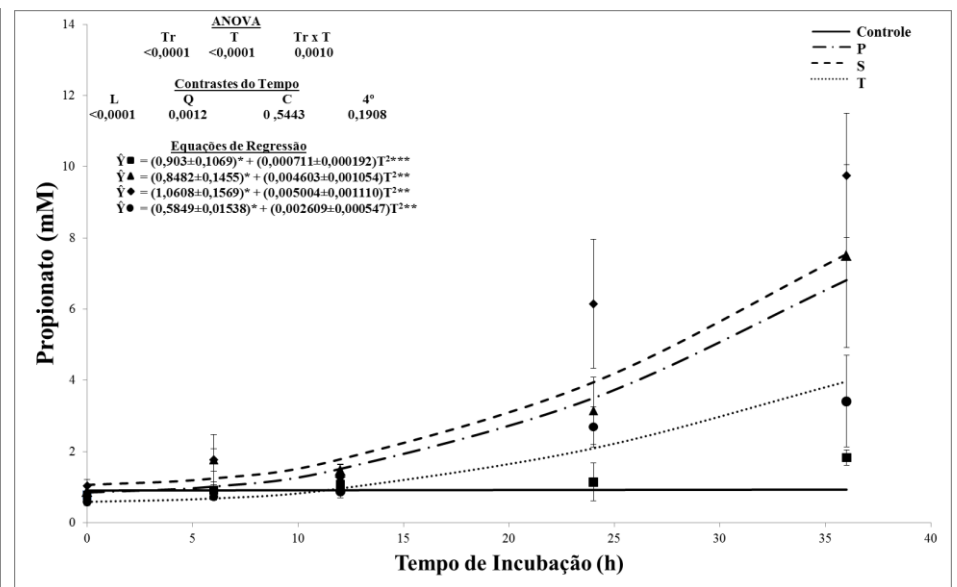
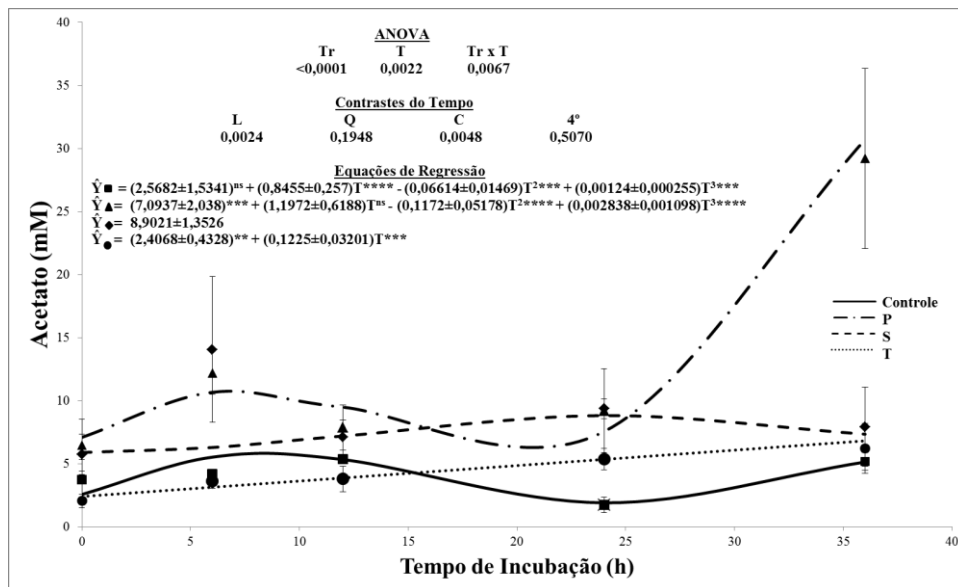


Figura 3 – Concentrações de acetato (A), propionato (B), butirato (C) e relação acetato:propionato(D) em mM. *significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; ***significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; ****significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

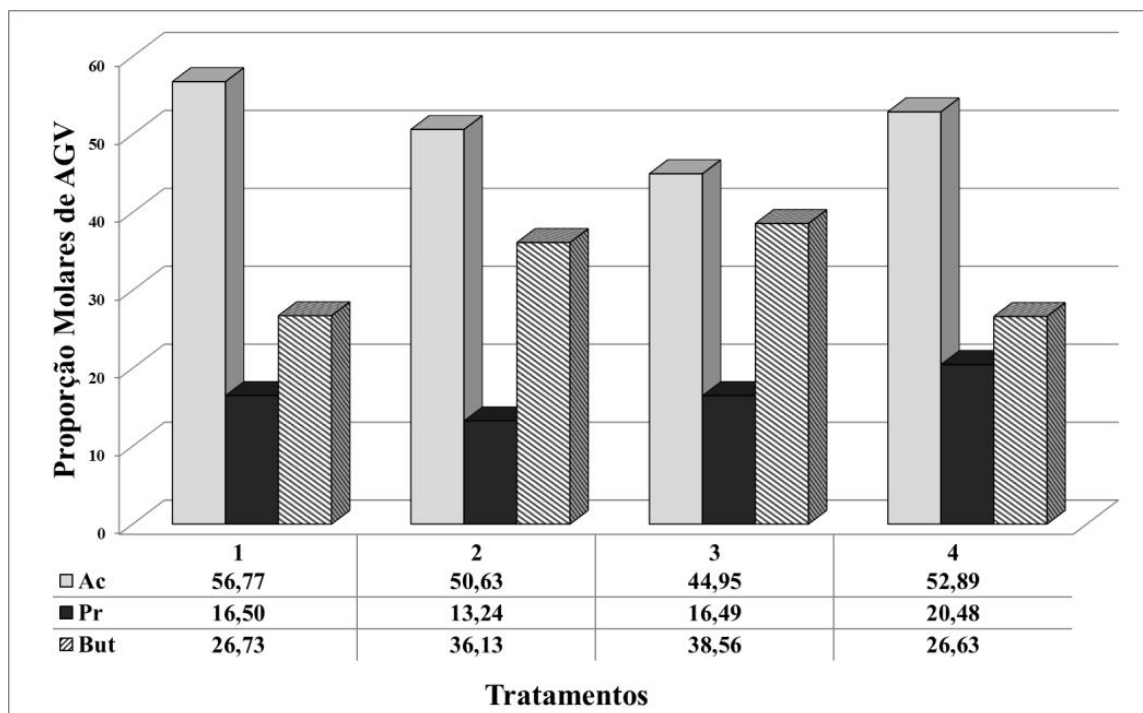


Figura 4 – Proporções molares da fermentação *in vitro* do farelo de trigo associado ao: DMSO (1) e aos extratos etanólicos de *P. juliflora* (2); *S. saman* (3) e *S. tubulosa* (4).

Provavelmente, o extrato bruto obtido por percolação com etanol continha oligossacarídeos, principalmente sacarose, aumentando o teor de carboidratos não fibrosos nos extratos obtidos. A sacarose serve de substrato, especialmente para *Butyribrio* sp., que é o principal gênero na produção de butirato (STEWART et al., 1997; RUSSELL, 2002). Entretanto, ao observar o tratamento controle, percebe-se que também houve aumento de butirato; é possível que tenha ocorrido algum tipo de seleção que favoreceu esses microrganismos produtores de butirato por meio do DMSO utilizado, pois se sabe que este produto apresenta toxicidade sobre algumas bactérias.

A análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico são técnicas de análise multivariada com fundamentos teóricos bem diferentes, podendo ser aplicadas independentemente. Estas técnicas podem ser complementares na informação sobre o conjunto de dados analisados. Ambas fornecem uma visão mais global das amostras dentro do conjunto de dados, conforme as variáveis usadas. A análise de componentes principais reduz a quantidade de variáveis originais num conjunto menor, preservando o máximo da variabilidade original (CAZAR, 2003). Cada vetor aponta para a direção de aumento para uma dada variável e o seu comprimento indica a força da correlação entre as variáveis (ABDALLA et al., 2012).

As análises realizadas evidenciaram confiabilidade na interpretação dos dados, explicando 99,2% da variação dos dados. O primeiro eixo (CP 1), gerado para cada análise de ordenação, explica a maior parte da distribuição dos dados. Observa-se que ocorreu um

deslocamento dos tratamentos com farelo de trigo associado ao DMSO (Cont) e ao extrato etanólico de *S. tubulosa* (T) para a parte negativa do gráfico em CP 1, indicando que estes tratamentos apresentam diferenças em relação aos demais. As variáveis com correlações positivas que mais influenciaram a discriminação dos tratamentos (farelo de trigo associado aos extratos etanólicos de *P. juliflora* (P) e *S. saman* (S)) à direita do gráfico em CP 1 foram, nesta ordem, Bt, Pr, Ac e A:P. Esta forte correlação evidenciada nesta análise pode explicar a questão da seleção microbiana para microrganismos produtores de butirato.

Aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação à esquerda em CP 1, quais foram, pH e N-NH₃, na ordem (Figura 5)(Tabela 9). Os tratamentos com farelo de trigo associado ao DMSO (Cont) e ao extrato etanólico de *P. juliflora* (P) aparece afastado, deslocando-se positivamente, enquanto os demais tratamentos deslocam-se em sentido oposto. O CP 2 foi responsável em 22,8% da variação dos dados para o tratamento controle e com extrato de *P. juliflora*, influenciados pelas variáveis com correlação positiva, A:P e N-NH₃, na ordem.

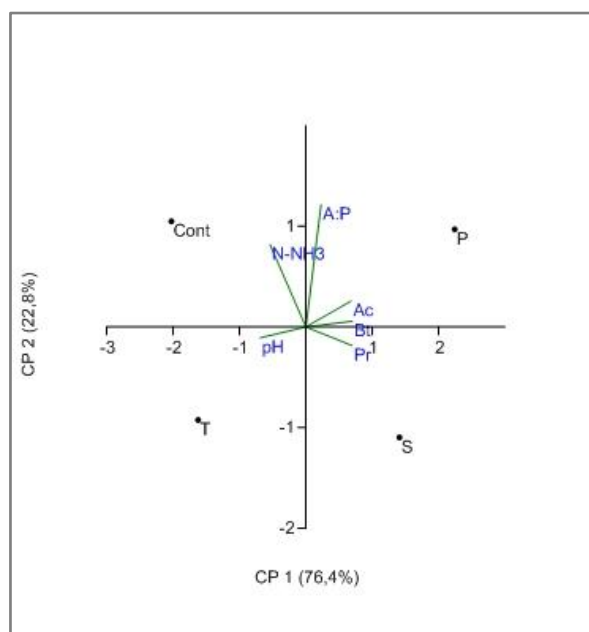


Figura 5 – Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e dos parâmetros de fermentação.

Em que: P – Extrato Etanólico de *Prosopis juliflora*; S – Extrato Etanólico de *Samanea saman*; T – Extrato Etanólico de *Samanea tubulosa*; Cont – Farelo de Trigo associado ao DMSO. N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; Ac – acetato; Pr – propionato; Bt – butirato; A:P – relação acetato: propionato.

Tabela 2 – Correlação entre variáveis de parâmetros fermentativos e cada componente principal (CP).

	pH	N-NH ₃	Ac	Pr	Bt	A:P
CP 1	-0,98	-0,77	0,97	0,99	1,00	0,32
CP 2	-0,08	0,63	0,20	-0,14	0,04	0,94

N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; Ac – acetato; Pr – propionato; Bt – butirato; A:P – relação acetato: propionato.

A DGGE é normalmente utilizada para determinar o número ou diferenças entre gêneros ou espécies de bactérias presentes na amostra. Neste trabalho foi possível observar diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR, com os iniciadores utilizados para a região V3 do 16S do rRNA para o domínio *Bacteria*, demonstrado pelo número e intensidades diferentes de bandas que, possivelmente, se trata de espécies distintas e predominantes. Os padrões de bandas obtidos mediante a DGGE foram utilizados para auxiliar na análise da estrutura das comunidades de microrganismos. A estimativa foi realizada pela análise de agrupamento do tipo *cluster*, a partir de uma matriz de dados de presença e ausência das bandas verificadas em cada amostra (Figura 6).

O dendograma Jaccard gerado dividiu-se em sete grupos, utilizando-se 50% como similaridade máxima, o ponto de união de todos os grupos apresenta 10% de similaridade. Observa-se que houve três agrupamentos bem definidos em função dos tratamentos em que foram inoculados extratos etanólicos de *P. juliflora* (P1 a P5), *S. saman* (S1 a S5) e *S. tubulosa* (T1 a T5). A inclusão dos extratos etanólicos causaram alterações na ecologia microbiana ruminal de bovinos por avaliação *in vitro*.

Essas alterações podem ser melhor visualizadas na Figura 7, onde observa-se a riqueza de bandas (espécies) para cada tratamento com inclusão dos extratos etanólicos em função do tempo de incubação. Tais modificações coincidem com as proporções dos produtos finais da fermentação ruminal, que mudam de acordo com o substrato e com o tempo de incubação, caracterizado pelo padrão diferenciado de bandas (Figura 6 e Figura 7).

Inicialmente, percebe-se que houve uma redução no número de bandas para o farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *P. juliflora*, de 6 a 36h após a incubação. Esta observação fica mais clara ao associarmos ao aumento nas concentrações de AGV no início do processo, provocando com isso a redução de pH, que foi menor que o controle, no entanto, o pH foi mantido estável durante todo o período de incubação (Figura 1). Outro fator que tem sido fortemente afetado neste caso é o N-NH₃, como mostrou a PCA (Figura 5). Conforme aumenta a concentração de N-NH₃ (Figura 2), reduz-se o número de bactérias, possivelmente isso se deva à presença de compostos antibacteriano ou bacteriostáticos nesse extrato, como taninos, promovendo o acúmulo de N-NH₃. Segundo Getachew et al. (2000), na fermentação *in vitro*, como não há reciclagem ou absorção de N-NH₃ pelo animal, a quantidade de amônia *in vitro* é resultado do balanço entre degradação, utilização pelos microrganismos e morte bacteriana que libera amônia.

A presença do tanino reduz algumas populações de bactérias celulolíticas e favorece o desenvolvimento de outras, devido à redução na competição, como sugerido por McSweeney et al. (2001), que verificaram um aumento nas populações de bactérias predominantemente proteolíticas, tais como *Prevotella*, *Megasphaera* e *Selenomonas*, que possuem atividade importante na descarboxilação de succinato a propionato.

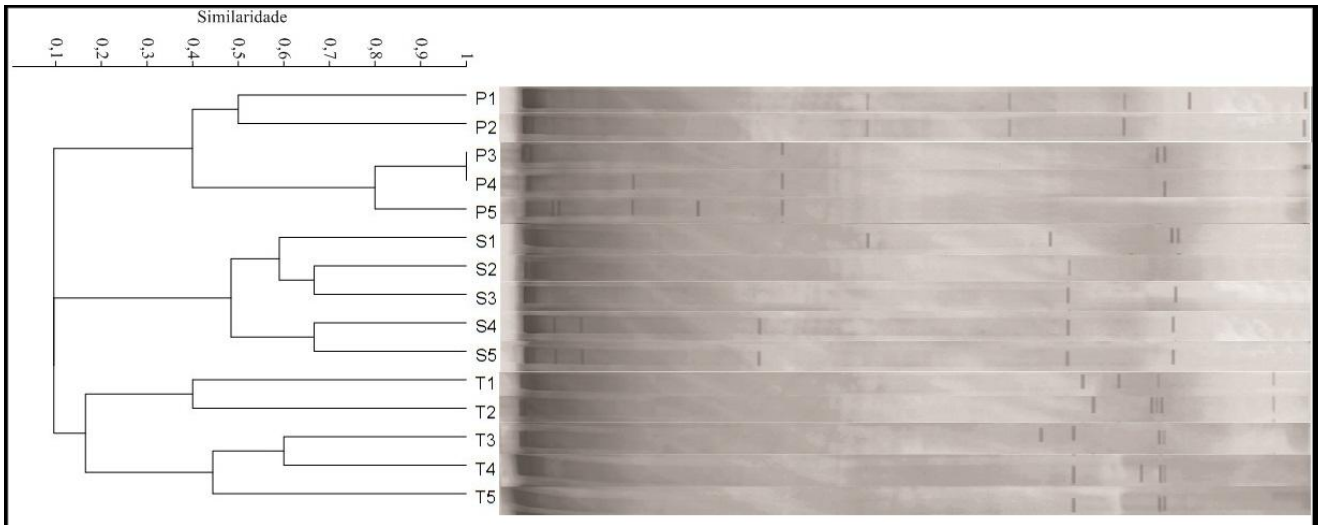


Figura 6 – Dendrograma Jaccard gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com *primers* para a região V3 do 16S do rRNA para bactérias.
Em que, P – Extrato Etanólico de *Prosopis juliflora*; S – Extrato Etanólico de *Samanea saman*; T - Extrato Etanólico de *Samanea tubulosa*; 1-5 equivalem aos tempos de incubação (6, 12, 24, 36 e 96 h).

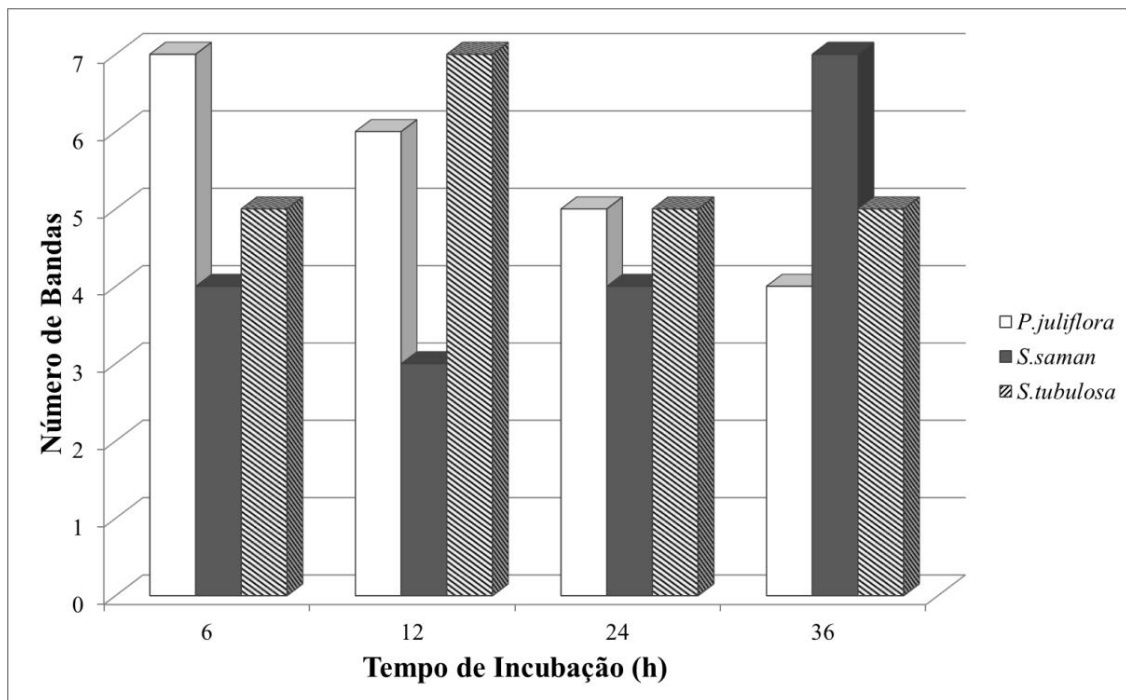


Figura 7 – Riqueza de bandas para o domínio *Bacteria* considerando os tempos de incubação (h) com adição dos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*; *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*.

Ao se avaliar número de bandas para o tratamento com farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *S. saman*, visualiza-se dois momentos, de 6 a 12h e de 24 a 36h após a

incubação (Figura 7). No primeiro momento, observa-se redução no número de espécies, sugerindo hipótese igual à utilizada para a inclusão do extrato de *P. juliflora*. No segundo momento, de 24 a 36h após a incubação, houve aumento no número de bandas. Analisando as condições de fermentação, nota-se que, neste período, o pH se encontra no ponto de mínimo (5,9), percebe-se também que a concentração de acetato e propionato foram maiores que os demais tratamentos e a concentração de butirato foi menor em relação ao extrato de *P. juliflora*. Nesse tratamento, também se observou diminuição na proporção molar de acetato (Figura 4), e uma redução na relação acetato:propionato (Figura 3D).

Na estimativa do número de bandas para o tratamento utilizando o extrato etanólico de *S. tubulosa*, ocorreu de modo contrário ao extrato de *S. saman*. No início, de 6 a 12h após incubação, aconteceu aumento no número de espécies. Esse extrato promoveu um pH mais elevado em relação aos demais tratamentos, entretanto, o pH reduziu em função do tempo (Figura 1), isso por causa da menor concentração de acetato e butirato, aumentando a concentração de propionato (Figura 3).

Tem sido relatado que os concentrados apresentam em sua estrutura física menor quantidade de carboidrato fibroso que forrageiras e à medida que aumentam na dieta eleva-se a proporção de propionato e diminui-se a proporção de acetato produzido no processo fermentativo, ocorrendo algumas vezes decréscimo também de butirato (JOHNSON e JOHNSON, 1995), que se refletirá em maior impacto na produção final de metano.

As mudanças que a taxa de fermentação sofre com dietas ricas em concentrados são mais fáceis de prever, pois a microbiota é menos variada que nas dietas à base de forragem (CHURCH, 1993), como pode ser visualizada na Figura 6 e Figura 8.

O diagrama de Venn demonstra claramente o agrupamento de bandas (espécies) que podem ser compartilhadas ou específicas de cada “grupo amostrado” (Figura 8). Na avaliação das comunidades microbianas, pode-se observar que houve uma redução no número de bandas para a população bacteriana, quando houve a incubação de farelo de trigo associado com extrato etanólico de *S. saman* (10 bandas). Este extrato também apresentou o menor número de bandas raras (6 bandas), isso se deve ao menor valor de pH, seguido do extrato de *S. tubulosa*, com 12 bandas, e do extrato de *P. juliflora*, com 13 bandas. Desse modo, pode-se sugerir que os extratos etanólicos utilizados promovem uma diversidade diferenciada para cada um, devido às diferenças observadas no número de bandas raras e as poucas bandas compartilhadas entre os tratamentos, sendo fatores decisivos na seleção da comunidade bacteriana do rúmen.

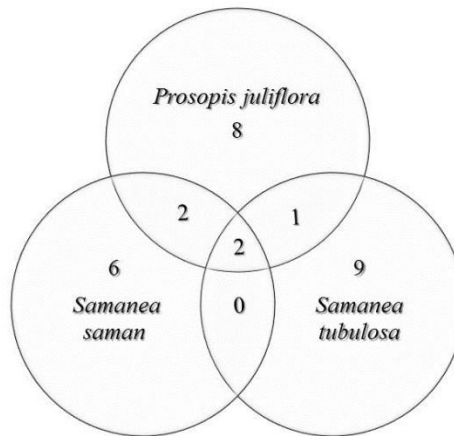


Figura 8 – Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para bactérias. Em que, CM – fluido ruminal utilizado na incubação.

4 CONCLUSÃO

A utilização de farelo de trigo associado a extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* promoveu melhor padrão de fermentação por meio da técnica *in vitro*, reduziu a relação acetato: propionato no líquido ruminal e alterou a população bacteriana ruminal, confirmando que a mudança na composição da dieta altera as populações microbianas.

5 REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; SALAM, S.M.A.H.; BUENO, I.C.S.; TSAI, S.M.; FIGUEIRA, A.V.O. In vitro evaluation, in vivo quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. **Tropical Animal Health and Production**. v.44, n.5, p.953-964. 2012.
- ARGÔLO, L.S.; PEREIRA, M.L.A.; DIAS, J.C.T.; CRUZ, J.F.; DEL REI, A.J.; OLIVEIRA, C.A.S. Farelo 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.
- AZHAR, I.; MOHTASHEEMUL, H.; MAZHAR, F.; ALI, M.S. Some biological evaluations on *Samanea saman*. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.26, n.1, p.47-53. 2009.
- BHATTA, R.; VAITHIYANATHAN, S.; SINGH, N.P.; VERMA, D.L. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. **Small Ruminant Research**. v.67, p. 75-83. 2007.
- BODAS, R.; LÓPEZ, S.; FERNÁNDEZ, M.; GARCÍA-GONZÁLEZ, R.; RODRÍGUEZ, A.B.; WALLACE, R.J.; GONZÁLEZ, J.S. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**. v.145, p.245-258. 2008.
- BUNGLAVAN, S.J.; VALLI, C.; RAMACHANDRAN, M.; BALAKRISHNAN, V. Effect of supplementation of herbal extracts on methanogenesis in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**. v.22, n.11, 216. 2010.
- CAZAR, R. A. An exercise on chemometrics for a quantitative analysis course. **Journal of Chemical Education**. v.9, 1026-1029. 2003.
- ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**. v. 44, n. 9, p. 1768-1771. 1961.
- GÁLFI, P.; GABEL, G.; MARTENS, H. Influence of intracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. **Research in Veterinary Science**. v.54, p.102-109. 1993.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S. Tropical browses: contents of phenolic compounds, estimation of energetic value and stoichiometrical relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **Journal of Agricultural Science**. v.139, p.341-352. 2002.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Effects of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. **British Journal of Nutrition**. Cambridge. v.84, p.73-83. 2000.
- HART, K.J.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; DUVAL, S.M.; MCEWAN, N.R.; NEWBOLD, C.J. Plant extracts manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**. v.147, p.8-35. 2008.

- KHAMPA, S.; WANAPAT, M. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids supplementation in ruminants raised in the tropics. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.6, n.1, p.20-27. 2007.
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. Van. Structural diversity of microbiol. Communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprint and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**. v. 17, p. 31-42. 2001.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**. v.37, p.547-579. 1901.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal Animal Science**. v.73, n.8, p.2483-2492. 1995.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal Animal Science**. v.76, p. 2190-2196. 1998.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. **SAS[®] system for mixed models**. Cary, 633p. 1996.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. et al. **SAS[®] system for mixed models**. 2nd Edition, Cary, 824p. 2006.
- LÓPEZ, S. CARRO, M.D.; GONZÁLEZ, J.S.; OVEGERO, F.J. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate degradation of hays in the rumen. **Animal Feed Science and Technology**. v.73, p.99-113. 1998.
- MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; MCDONALD, I. Rate of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. **British Journal of Nutrition**. v.38, n.3, p.437-443. 1977.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.3, p.695-700. 1993.
- MCEWAN, N.R.; ABECIA, L.; REGENSBOGENOVA, M.; ADAM, C.L.; FINDLAY, P.A.; NEWBOLD, C.J. Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. **Letters in Applied Microbiology**. v.41, p. 97-101. 2005.
- MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D.O. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**. v.90, p.78-88. 2001.
- NGAMSAENG, A.; WANAPAT, M.; KHAMPA, S. Evaluation of the local tropical plants by *in vitro* rumen fermentation and their effects on fermentation end-products. **Pakistan Journal of Nutrition**. v.5, n.5, p.414-418. 2006.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Fermentation ruminal. In: CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiología Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap. 8, p. 159-189.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (ed.). **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 1993. p.145-171.

- PRESTON, T.R.; LENG, R.A. **Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics**. Armidale, Pernambul books, 245p. 1987.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, NY. 119p. 2002.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v.32, n.2, p.199-208. 1974.
- SAWAL, R.K.; RATAN, R.; YADAV, S.B.S. Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource livestock – A Review. **Asian-Australasian Journal Animal Science**. v.17, n.5, p.719-725. 2004.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G + C - rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of National Academy of Science**. v.86, n.1, p.232-236. 1989.
- SLIWINSKI, B.J.; SOLIVA, C.R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**. v.101, p.101-114. 2002.
- TABOSA, I.M.; SOUZA, J.C.; GRAÇA, D.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N.; RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigemial nuclei in goats caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods. **Veterinary and Human Toxicology**. v.42, p.155-158. 2000.
- TSAI, Y.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2292-2295. 1992.
- THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B. A simple gas production method using a pressure transducer to determine fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science Technology**. v.48, p.185-197. 1994.
- UKOHA, P.O.; CEMALUK, E.A.C.; NNAMDI, O.L.; MADUS, E.P. Tannins and other phytochemical of the *Samanea saman* pods and their antimicrobial activities. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**. v.5, n.8, p.237-244. 2011.
- 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 proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. 1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Viçosa – Universidade Federal de Viçosa.
- YOKOYAMA, M.T.; JOHNSON, K.A. Microbiología del rumen e intestino. In: CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiologia Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap.7, p. 137-157.

CAPÍTULO 3

EXPERIMENTO *in vitro* “EXTRATOS – PRODUÇÃO DE GASES”

**Fermentação *in vitro* por Microbiota Ruminal de Bovinos com
Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas
Tropicais**

**In vitro Fermentation by Ruminal Microbes of Cattle with Ethanol
Extract obtained from the Brans Pods Tropical Legumes**

RESUMO

ARGÔLO, L.S. **Fermentação *in vitro* por Microbiota Ruminal de Bovinos com Extratos Etanólicos obtidos de Farelos de Vagens de Leguminosas Tropicais.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Tese - Doutorado em Zootecnia - Produção de Ruminantes).*

O objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros da cinética de degradação ruminal das frações de carboidratos fibrosos e não fibrosos sobre a diversidade de arqueas metanogênicas no rúmen e sobre a degradação *in vitro* da matéria seca utilizando extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*. Foram realizadas determinações de teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), lignina, carboidratos totais (CT) e carboidratos não fibrosos (CNF) dos farelos de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*, que foram percolados por etanol para obtenção dos extratos. Os dados da produção de gases foram ajustados ao modelo logístico bicompartimental. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão à significância de 5% de probabilidade. As equações de regressão para a degradabilidade da MS (DMS) em função da produção de gases (PG) apresentou efeito quadrático negativo para todos os tratamentos. Houve efeito da interação níveis de extratos vs tempo de incubação para a quantidade de metano produzida. A diversidade genética de arqueas foi determinada por meio da DGGE dos produtos de PCR da região 1100-1400 do 16S rDNA, obtidos de *primers* universais para procariotos. O protocolo desenvolvido incluiu a otimização de: procedimentos na extração do DNA, amplificação pela PCR e otimização de preparação do gel de DGGE. Observou-se variações nos padrões de bandas do gel, indicando alterações das populações estudadas em função dos tratamentos. Os extratos etanólicos de *Prosopis juliflora* e *Samanea tubulosa* apresentaram potencial para mitigação de metano.

Palavras-chave: fermentação *in vitro*, metano, PCR-DGGE, *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa*, taxa de degradação.

*Orientadora: Prof^ª. Dr.^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira, UESB; e Coorientadores: Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias, UESC; Prof. Dr. Mauro Pereira Figueiredo, UESB; e Prof. Dr. Ronan Batista, UESB.

ABSTRACT

ARGÔLO, L.S. *In vitro* Fermentation by Ruminal Microbes of Cattle with Ethanol Extracts obtained from the Brans Pods Tropical Legumes. Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Thesis – Doctor Degree in Animal Science – Production of Ruminant).*

The objective of this study was to evaluate the parameters of ruminal degradation kinetics of carbohydrate fractions of fibrous and non-fibrous on the diversity of methanogenic archaea in the rumen and on the *in vitro* degradation of dry matter using ethanol extracts of *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* and *Samanea tubulosa*. Determinations were carried out in dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), ether extract (EE), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) detergent insoluble nitrogen neutral (NDIN), acid detergent insoluble nitrogen (ADIN), lignin, total carbohydrates (TC) and non-fiber carbohydrates (NFC) of *P. juliflora*, *S. saman* and *S. tubulosa* brans were percolated with ethanol to obtain the extracts. The gas production data were fitted to the logistic model bicompartmental. The experimental design was completely randomized. The data were subjected to analysis of variance and regression significance of 5% probability. The regression equations for the DM degradability (DMD) as a function of gas production (GP) showed negative quadratic effect for all treatments. A significant interaction extracts levels versus incubation time for the amount of methane produced. Genetic diversity of archaea was determined by DGGE of PCR products in the region 1100-1400 of 16S rDNA obtained from universal primers for prokaryotes. The protocol developed included the optimization: procedures in DNA extraction, PCR amplification, and optimization of preparation of the DGGE gel. A variation in the pattern of bands from the gel, indicating changes in the population studied in function of the treatment. The ethanol extracts of *P. juliflora*, *S. saman* and *S. tubulosa* showed potential for mitigation of methane.

Keywords: degradation rate, *in vitro* fermentation, methane, PCR-DGGE, *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa*.

* Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, *D. Sc.*, UESB; and Co-advisers: João Carlos Teixeira Dias, *D. Sc.*, UESC; Mauro Pereira Figueiredo *D. Sc.*, UESB; and Ronan Batista, *PhD.*, UESB.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento dos diversos fatores que afetam e determinam a emissão de metano é de fundamental importância ao processo de minimização do impacto ambiental gerado pelos sistemas de produção animal. As emissões globais de metano, provocadas a partir dos processos entéricos, são estimadas em 80 milhões de toneladas por ano (US EPA, 2000). Por meio do processo digestivo de fermentação entérica, os ruminantes são reconhecidos como os principais responsáveis, contribuindo com cerca de 15% do total das emissões de metano (JOHNSON e JOHNSON, 1995). A taxa de emissão de metano é também afetada pela qualidade do alimento, logo, a importância da manipulação da dieta para os ruminantes, em detrimento de uma redução nas emissões de metano, é essencial.

A produtividade dos ruminantes depende, sobretudo, da adequada nutrição com respeito principalmente à composição e à qualidade dos ingredientes da dieta, que irá interferir na ingestão voluntária e na digestibilidade. Logo, a determinação do valor nutricional dos alimentos torna-se indispensável e os novos programas de avaliação de rações requerem informações sobre a cinética de fermentação que, por sua vez, é dependente da taxa de passagem e da taxa de degradação.

A taxa e a extensão de fermentação da matéria seca no rúmen são determinantes cruciais dos nutrientes utilizados pelos ruminantes (JANCÍK et al., 2010). A relevância de avaliar o valor nutricional das forragens é particularmente importante em regiões semiáridas, onde a disponibilidade de forragem de qualidade pode ser severamente limitada durante a estação seca. Estas avaliações também são importantes numa perspectiva ambiental, visto que os produtos da fermentação ruminal, excreção de nutrientes não digeridos, bem como a emissão de gases entéricos de efeito estufa, afetam o ambiente (GETACHEW et al., 2005; MAKKAR, 2005).

No entanto, a determinação da ingestão e digestibilidade dos ingredientes por métodos *in vivo* são demoradas, laboriosas, caras e requerem grandes quantidades de alimento, além de serem inadequadas para avaliação de alimentos em larga escala (FRANCE et al., 2005; GETACHEW et al., 2005). O método *in vitro* de produção de gases, por sua vez, tem numerosas vantagens sobre os outros métodos, a principal é que a cinética de fermentação pode ser estudada com uma única amostra e, conseqüentemente, uma quantidade relativamente pequena de amostra é suficiente, permitindo, assim, que grande número de amostras seja avaliado simultaneamente, tornando o método mais apropriado para caracterizar alimentos, inclusive partículas solúveis ou pequenas, e pode ser automatizado, reduzindo, assim, a interferência humana (ADESOGAN, 2005; GETACHEW et al., 2005; MAKKAR, 2005). Esta técnica simula os processos digestivos gerados pela atividade microbiana que nos ajudam a compreender a

fermentação e degradabilidade alimentar como uma função da qualidade nutricional e disponibilidade de nutrientes para as bactérias.

As pesquisas têm avançado no sentido de propor ingredientes facilmente disponíveis localmente. Para as regiões semiáridas, a introdução de leguminosas lenhosas de múltiplo propósito tem sido bastante difundida. A utilização de leguminosas vem apresentando bons resultados de ganho de peso e produção de leite em diversas espécies, por exemplo.

Entretanto, o valor nutritivo das leguminosas é prejudicado, devido à presença de fatores antinutricionais, como taninos, terpenos, alcaloides, saponinas, lectinas, que limitam a utilização como alimento para os animais, pois alguns desses tem efeito tóxico (SATISH et al., 1999; BHATTA et al., 2007; HART et al., 2008), mas tem sido estudados na manipulação da função ruminal (GREATHEAD, 2003; HART et al., 2008), sendo explorados como aditivos alimentares, uma vez que muitos compostos apresentam ações antimicrobianas (JOUANY e MORGAVI, 2007; HART et al., 2008; PEN et al., 2008), desde a introdução na União Europeia da legislação 1831/2003 (EC, 2003), que proíbe o uso de antibióticos como promotores de crescimento na alimentação animal, preocupados com os risco de resistência a antibióticos em humanos (CASEWELL et al., 2003) e a ocorrência de resíduos em alimentos de origem animal (YANG e CARLSON, 2004; JOUANY e MORGAVI, 2007).

Extratos de plantas têm o potencial de serem explorados como agentes manipuladores do rúmen. Substâncias antimicrobianas já foram identificadas e podem manipular as atividades e os números das populações de bactérias, protozoários, fungos e arqueas. Os efeitos são variados e, muitas vezes, contraditórios, acontece provavelmente porque há diferenças nos extratos de plantas utilizadas (a concentração e natureza do ingrediente ativo pode variar mesmo dentro das mesmas espécies cultivadas em locais diferentes e ainda mais amplamente entre espécies de plantas, mesmo intimamente relacionada), concentrações e, possivelmente, também na dieta basal (HART et al., 2008). As modernas técnicas de perfis moleculares estão começando a ser empregadas para melhor descrever as alterações nas populações microbianas do rúmen, quando extratos vegetais são ingeridos.

Objetivou-se avaliar os parâmetros da cinética de degradação ruminal das frações de carboidratos fibrosos e não fibrosos sobre a diversidade de arqueas metanogênicas no rúmen e sobre a degradação *in vitro* da matéria seca, utilizando extratos etanólicos obtidos de farelo de vagem de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* como aditivos alimentares.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparação do Extrato Etanólico Bruto (EE)

As vagens de *Samanea saman* e *Samanea tubulosa* foram adquiridas no município de Itapetinga-Bahia-Brasil e as vagens de *Prosopis juliflora* foram obtidas no município de Brumado-Bahia-Brasil. Uma excisata de cada material encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia-Brasil.

Os farelos de vagens das leguminosas foram produzidos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-Bahia-Brasil. As vagens coletadas foram secas ao sol durante três dias. Em seguida, foram processadas em um triturador e moídas com peneira de 2 mm para obtenção do farelo. Após a moagem, as amostras, então, foram destinadas à estufa de ventilação forçada, por 72 horas a $60 \pm 5^\circ\text{C}$, em seguida, foram trituradas novamente em moinho tipo facas, com peneira de malha de 1 mm e, finalmente, acondicionadas individualmente em recipientes plásticos, para posteriores análises. As composições químicas dos farelos utilizados para a obtenção dos extratos etanólicos, bem como do farelo de trigo, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química dos Farelos de Vagem de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa* e do farelo de trigo.

Item	<i>Prosopis juliflora</i>	<i>Samanea saman</i>	<i>Samanea tubulosa</i>	Farelo de Trigo
Matéria Seca	92,2	85,8	90,9	89,8
Matéria Mineral	3,8	4,0	3,6	7,1
Matéria Orgânica	95,8	96,0	96,4	83,9
Proteína Bruta	7,2	17,7	12,4	17,4
Fibra Detergente Neutro	26,7	32,2	44,4	51,1
Fibra Detergente Ácido	23,5	24,9	37,4	7,1
Carboidratos Totais	87,4	77,9	83,9	73,1
Carboidratos Não Fibrosos	60,7	45,7	39,5	22,0
Hemicelulose	3,4	7,3	7,0	44,0
Celulose	18,6	12,6	13,3	3,5
Lignina	4,9	12,3	24,1	3,6
NIDA ¹	0,1	0,2	0,4	--
NIDN ²	0,2	0,3	0,3	--
Extrato Etéreo	1,6	0,4	0,1	2,4
Tanino ³	0,45	17,58	145,06	nd ⁴

¹nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), ²nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), ³valores expressos em equivalente-grama de leucocianidina/ kg de matéria seca, ⁴não detectado.

Aproximadamente 2 kg de cada farelo foram submetidos à extração por percolação com etanol a 95%, em seguida, esta solução foi concentrada a vácuo a uma temperatura em torno de

70°C, em evaporador rotatório, obtendo, assim, os extratos etanólicos brutos (222 g, 230,2 g e 381,6 g para farelo de vagem de *P. juliflora*, *S. saman* e *S. tubulosa*, respectivamente). O aspecto desses extratos era viscoso de coloração castanho-escuro.

2.2 Produção de gases

O experimento foi conduzido no *Campus* da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório de Nutrição Animal, Vitória da Conquista-Bahia-Brasil, situada às coordenadas geográficas 40° 50' 54" LS e 14° 51' 04" LO.

A produção de gases *in vitro* foi realizada conforme o protocolo de análise descrita por Mauricio et al. (1999), considerando o volume de gases produzido a partir da medição da pressão gerada pelo acúmulo de gases durante o processo fermentativo das amostras incubadas. Realizaram-se três rodadas de incubação, com três repetições por tratamento e três frascos contendo apenas meio nutriente e fluido ruminal, que serviu como os brancos da técnica. A produção de gases destes últimos foi descontada das obtidas nos frascos que continham amostras.

A cada frasco de 160 mL foi adicionado 80 mL de meio nutriente (THEODOROU et al., 1994), CO₂, 1 g de farelo de trigo (1 mm), 10 mL das amostras, de acordo com os tratamentos: 1) extrato etanólico de *P. juliflora*, 2) extrato etanólico de *S. saman*, 3) extrato etanólico de *S. tubulosa* e 4) controle (10 mL de uma solução DMSO; 1% v/v), além de 10 mL do inóculo. Os extratos etanólicos foram previamente diluídos em água, utilizando como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO), perfazendo 1% do volume total da solução.

O meio nutriente foi preparado misturando uma Solução-tampão (200 mL), que continha NH₄HCO₃ (4,5 g/L) e NaHCO₃ (39,4 g/L) que foi misturado com água destilada (500 mL), solução de macrominerais (200 mL; Na₂HPO₄.12H₂O, 10,6 g/L; KH₂PO₄, 7,0 g/L; MgSO₄.7H₂O, 0,7 g/L), solução micromineral (0,1 mL; CaCl₂.2H₂O, 148,5 g/L; MnCl₂.4H₂O, 112,5 g/L; CoCl₂.6H₂O, 11,3 g/L; FeCl₃.6H₂O, 90,0 g/L), solução de meio B (60 mL; cisteína HCl, 7,0 g/L; Na₂S.9H₂O, 7,0 g/L; NaOH, 1,8 g/mL) e resazurina solução (1,0 mL; 0,01 g/L).

2.3 Coleta e Preparo do Inóculo

O fluido ruminal utilizado nas inoculações foi obtido de três vacas mestiças Holandesas fistuladas cirurgicamente no rúmen, mantidas em confinamento, cuja dieta era exclusiva de volumoso (*Brachiaria* spp.), cada vaca representou uma rodada de incubação. As vacas foram mantidas em jejum hídrico e alimentar nas 12 horas que antecederam a coleta do fluido ruminal. Após a coleta, estes foram armazenados em garrafas térmicas para o transporte até o laboratório, onde foram filtrados em tecido de nylon com porosidade de 100 micras, misturados nas mesmas proporções e saturados com CO₂, mantidos em banho-maria a 39°C.

O fluido ruminal (10 mL) foi inoculado nos frascos contendo as amostras e meio de cultura, vedados com tampa de borracha expansiva e mantidos em estufa a 39°C até o momento das coletas para avaliação dos parâmetros fermentativos. O meio de fermentação nos frascos de vidro atingiu um volume final de 100 mL.

2.4 Horários de Leitura

As leituras de pressão dos gases produzidos durante os ensaios foram realizadas às 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 30; 36; 48; 72 e 96 horas após o início das incubações. As leituras de pressão dos gases (psi – pressão por polegada quadrada) foram realizadas de forma semiautomática, por intermédio de um transdutor de pressão (Tipo T443A, Bailey e Mackey, Inglaterra), com uma agulha (25 x 7 mm) acoplada à sua extremidade. As medidas de pressão obtidas foram ajustadas para o volume de gases, conforme a equação proposta por Figueiredo et al. (2003), para a altitude local:

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

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

2.5 Degradabilidade *in vitro* e Produção de Biomassa Microbiana

As degradações *in vitro* das amostras foram determinadas às 6; 12; 24; 36 e 96 horas após a inoculação. A degradabilidade ruminal foi estimada como a diferença entre a quantidade de amostra colocada para fermentar em cada frasco e a quantidade de resíduo recuperado por filtração em cadinho de porosidade nº 1 (Vidrotec®) de pesos previamente conhecidos.

A produção de biomassa microbiana foi estimada a partir da diferença obtida entre a degradabilidade verdadeira e aparente da matéria seca (MS).

Em uma das réplicas, foi determinada a degradabilidade aparente da MS através da filtração direta do resíduo obtido após a fermentação da amostra em cadinho de vidro nº 1, e posterior secagem em estufa a 105°C durante 24 horas (MAURICIO et al., 1999). Para determinação da degradabilidade verdadeira da MS, a outra réplica da mesma amostra foi submetida à digestão com solução detergente neutro por 1 hora, em seguida, filtrada em cadinho de vidro nº 1 e seca em estufa a 105°C por 24 horas (GOERING e VAN SOEST, 1970). As degradabilidades foram determinadas em cada tempo de degradação.

A biomassa microbiana (mg 100 mg⁻¹ de MS digestível) foi obtida de acordo com Blümmel et al. (1997):

$$\text{Biomassa microbiana (mg 100 mg}^{-1}\text{)} = \text{DVI (mg 100 mg}^{-1}\text{)} - \text{DA (mg 100 mg}^{-1}\text{)}$$

Em que: DVI corresponde à degradabilidade verdadeira *in vitro* da MS e DA à degradabilidade aparente *in vitro* da MS.

2.6 Fator de Partição

Fator de partição (FP) é definido como a relação entre o substrato verdadeiramente degradado *in vitro* e o volume de gases (mL) produzido pela mesma amostra em determinado tempo de incubação (BLÜMMEL et al., 1997).

$$FP = \frac{\text{mg de MS verdadeiramente degradada}}{\text{Produção de gases (mL)}}$$

2.7 Quantificação do Metano

Ao final das incubações, em cada tempo proposto, 6; 12; 24; 36 e 96 horas após a inoculação, uma seringa com capacidade de 10 mL, bem graduada e contendo 4,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH; 10 M), foi ligada à extremidade inferior de uma outra seringa por meio de uma válvula de 3 bicos, a qual foi introduzida aos frascos de incubação com auxílio de uma agulha (25 x 7 mm) acoplada à sua extremidade, de forma que evitasse, assim, escape do gás e preenchido 4,0 mL de gás. A mistura do conteúdo com NaOH permite a absorção de CO₂, então, o volume de gás remanescente na seringa é considerado CH₄ (FIEVEZ et al., 2005).

2.8 Extração de DNA, Amplificação por PCR

Nos Laboratórios de Monitoramento Ambiental e Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus-Bahia-Brasil), o DNA microbiano total foi extraído do conteúdo ruminal dos frascos de incubação, coletado nos tempos 6; 12; 24; 36 e 96 horas de incubação e, imediatamente, armazenados em congelador a -20°C. Posteriormente, essas amostras foram descongeladas e submetidas a um processo de lavagem com PBS 1x (Solução Salina Tamponada) e centrifugações a 7 000 x g por 15 minutos. Foi adicionado ao pélete, 600 µL de TESC (10 M Tris-base, 1 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,3) juntamente com 30 µL de Tween 80 (Merck) e homogeneizado. A amostra foi submetida ao banho ultrassônico Magiclean 1600 (Unique®) por 2 minutos, para que houvesse desfloculação das partículas bacterianas, que possivelmente poderiam estar aderidas à matéria orgânica.

Após o banho ultrassônico, as amostras foram novamente centrifugadas por 3 minutos a 50 x g e. Coletou-se o sobrenadante que, por sua vez, foi centrifugado a 7 000 x g por 5 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o pélete foi ressuspensão em 700 µL de Tampão de Lise (50mM:50mM:500mM), 12 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹) (Promega) e 12 µL de SDS 10% (Dodecil Sulfato de Sódio) foram adicionados às amostras, homogeneizando pela inversão dos tubos. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 65°C, por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos.

A lise física das células bacterianas foi realizada por meio de choque térmico, em três ciclos, 10 minutos em ultra *freezer* (80°C negativos) e 5 minutos em banho-maria a uma temperatura de 80°C. Um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, e a mistura foi gentilmente homogeneizada. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1 800 x g e a fase aquosa foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,7 volume de isopropanol gelado (J.T. Barker) e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. A solução foi misturada suavemente (5-10 vezes) e mantido a 20°C negativos por 16 h. Foi obtido o pélete das amostras por centrifugação durante 5 minutos a 10 000 x g, o pélete foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspensão em 50-100 µL de TE clássico (10 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0).

Quando necessário, o DNA extraído foi purificado em mini-colunas empacotadas com matriz de gel Sephadex G-200 equilibradas com TE clássico segundo (TSAI e OLSON, 1992). Um volume de 250 µL do eluente foi adicionado às colunas juntamente com o DNA de cada amostra, e posteriormente incubadas em banho-maria (50-60°C) por 10 minutos, sendo em seguida centrifugadas por 2 minutos a 1 800 x g.

As análises da diversidade microbiana foram efetuadas através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Na amplificação dos fragmentos do DNA, foi utilizado o par de iniciadores específicos para identificação de arqueas metanogênicas 1100F (5' - AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G - 3'), junto com o grampo de GC e 1400 R (5' - CGG CGA ATT CGT CGT AGG AGC AGG GAC - 3'), descritos por Kudo et al. (1997). A utilização do grampo de GC, acoplado a um dos iniciadores, impede a completa separação das fitas do DNA, aumentando a sensibilidade da Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) (SHEFFIELD et al., 1989).

A mistura para reação da PCR (25 µL) consistiu de: 16,85 µL de Água Milli-Q estéril, 1x do Tampão da *Taq* polimerase, 2,1 mM de MgCl₂, 280 µM de cada iniciador (1100F com grampo de GC e 1400R), 280 µM de cada um dos dNTP e 2,5 U da Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (c. 20ng) em um volume final de 25 µL. A amplificação foi obtida seguindo o programa: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 90s, e extensão final a 72°C por 3 minutos. As reações foram analisadas em gel de agarose a 2% (m/v), corado com brometo de etídio, com transiluminador de luz ultravioleta (KODAK).

A DGGE foi realizada utilizando o Sistema para Análise de Mutações CDC 20 x 20 cm (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), sendo 20 µL dos produtos de PCR colocados em gel de poliacrilamida a 8% em 0,5 mmol L⁻¹ com gradiente desnaturante de 25% a 60% em tampão 0,5x Tris-Acetato-EDTA para análise da diversidade de arqueas, em uma corrida a voltagem, primeiramente, de 85 V por 15 minutos e, em seguida, de 200 V por 4 horas e 45 minutos a 60°C constante. As bandas de DNA foram visualizadas por coloração com prata.

2.9 Análises Estatísticas

A cinética da produção cumulativa de gases foi analisada empregando-se o modelo logístico bicompartimental (SCHOFIELD et al., 1994):

$$CT(t) = (VfCNF/(1+\exp(2-4*KdCNF*(T-L)))) + (VfCF/(1+\exp(2-4*KdCF*(T-L))))$$

Em que CT (t) é o volume acumulado no tempo t; VfCNF, o volume de gás oriundo da fração de rápida digestão (CNF); KdCNF (h^{-1}), a taxa de degradação da fração de rápida digestão (CNF); L, latência ou tempo de colonização em horas (*Lag time*); T, o tempo (h); VfCF, o volume de gás da fração de lenta degradação (B2); KdCF (h^{-1}), taxa de degradação da fração B2.

Os dados foram submetidos à análise de variância e de regressão com auxílio do programa Statistical Analyses System – SAS (SAS, 2006).

A regressão da produção para os parâmetros fermentativos, consumo e comportamento ingestivo utilizou-se o Proc MIXED do SAS (LITTEL et al., 1996). O modelo estatístico de regressão linear múltipla com duas variáveis independentes (ou seja, os níveis de substituição e tempo de coleta de dados) repetições por tratamento foi:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 Tr + \beta_2 Tr^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 TrxT + \varepsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado de Y resposta variável nos níveis Tr e T, na repetição k; β_n é o coeficiente de regressão associado com o fator de interesse (X_{1i} , X_{1i}^2 , X_{2j} , X_{2j}^2 , $X_{1i}X_{2j}$); X_{1i} é o valor do nível X_{1i} do X_1 variável independente; X_{2j} é o valor do nível de X_{2j} do X_2 variável independente; ε_{ijk} é o efeito do resíduo da regressão associado com cada Y_{ijk} valor observado, sendo $\varepsilon \sim NID(0, \sigma_\varepsilon^2)$. Em um delineamento inteiramente casualizado, $\varepsilon_{ijk} = \varepsilon_{ijk} + f_{aj}$, em que $f_{aj} = \mu_{Yij} - \hat{Y}_{ij}$, em que f_{aj} é a falta de ajuste do modelo para o Y_{ij} ponto.

A análise dos dados foi pelo procedimento MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). Os efeitos dos tratamentos e os tempos foram decompostos em contrastes polinomiais lineares a 4º grau. Além disso, a interação dos tratamentos ao longo do tempo foi examinada, usando a opção de fatia de MIXED e contrastes. A configuração mais baixa da informação Akaike critério (AIC) foi obtida utilizando o componente de variância (VC):

$$Y_{ijk} = \mu + Tr_i + T_j + Tr_i T_j + \varepsilon_{ijk}; NID(0; \sigma^2)$$

Em que: Tr = níveis de substituição (0; 33,3; 66,7 e 100%) e T = tempo (0; 2; 4; 6 e 8 h).

Para escolher a melhor equação, os fatores Tr e T e as interações não significativas em $P < 0,05$ foram retiradas do modelo. Os contrastes da interação foram utilizados para comparar o efeito dos níveis de extratos e interações ao longo do tempo em pH, N-NH₃, AGV.

As técnicas estatísticas multivariadas foram realizadas para avaliar a estrutura multivariada contida nos dados originais. A partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel. Para identificar a presença ou não de bandas, codificadas por 1 e 0, respectivamente (KOZDRÓJ e ELSAS, 2001). A partir dessa matriz de dados foi feita a análise de agrupamento por dendograma para a qual foi utilizado, para o cálculo da similaridade entre os indivíduos e pelo método de agrupamento UPGMA (método das médias das distâncias) com o coeficiente de Jaccard (1901) por meio do programa estatístico Past.

A análise Biplot aplicada às Componentes Principais (CP) foi utilizada para verificar a correlação entre as variáveis analisadas e identificar quais variáveis sofreram maior influência das dietas. Para esta análise, foi utilizado o programa Past. Para a confecção do gráfico de riqueza de espécies e os diagramas de Venn, foram utilizadas a Microsoft Excel 2010 e a Microsoft Power Point 2010, utilizando o padrão de bandas geradas no perfil do DGGE, considerando apenas os níveis de substituição do milho pelo farelo da vagem de algaroba.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 96 horas de incubação, o extrato etanólico de *S. saman* foi aquele que apresentou maior volume final da produção de gases (PG) cumulativa. O menor valor de produção de gases foi apresentado pela utilização de farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *S. tubulosa* (Tabela 2) (Figura 1).

Tabela 2 – Produção de gases (PG; mL), degradação da matéria seca (DMS; %) e fator de partição (FP; PG DMS⁻¹) do farelo de trigo com diferentes extratos etanólicos de farelo de vagens de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa* e controle (DMSO; 1% v/v) durante 96 h de incubação.

Hora	Extratos de Farelo de Vagens de Leguminosas											
	Controle ¹			<i>Prosopis juliflora</i> ²			<i>Samanea saman</i> ³			<i>Samanea tubulosa</i> ⁴		
	PG	DMS	FP	PG	DMS	FP	PG	DMS	FP	PG	DMS	FP
96	185,08	76,85	2,41	413,86	86,30	4,79	473,42	68,23	6,93	142,12	76,84	1,85
36	161,28	75,87	2,12	387,31	92,19	4,20	441,38	85,38	5,17	110,53	88,72	1,24
24	136,86	73,24	1,87	363,86	91,66	3,97	404,57	90,02	4,49	73,75	87,85	0,84
12	79,42	66,35	1,20	293,11	87,18	3,36	308,11	91,82	3,35	15,17	88,35	0,17
6	25,04	60,90	0,41	207,00	68,19	3,03	206,99	86,99	2,38	0,61	70,31	0,009

Equações de Regressões da DMS em função de PG:

$$^1\hat{Y} = (57,7601 \pm 1,054)^* + (0,7289 \pm 0,05952)T^* - (0,00553 \pm 0,000536)T^{2*}$$

$$^2\hat{Y} = (67,8483 \pm 6,3552)^* + (1,1314 \pm 0,3874)T^{****} - (0,00981 \pm 0,003565)T^{2****}$$

$$^3\hat{Y} = (67,7091 \pm 5,6623)^* + (1,0656 \pm 0,3198)T^{***} - (0,00903 \pm 0,002878)T^{2****}$$

$$^4\hat{Y} = (71,5398 \pm 6,0729)^* + (0,8515 \pm 0,3711)T^* - (0,00833 \pm 0,003472)T^{2*}$$

*significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; ***significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; ****significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

Houve efeito tanto do tempo de incubação quanto dos tratamentos sobre a degradabilidade da matéria seca (DMS) ($P < 0,001$). Observou-se um maior potencial de produção de gases para o farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *S. saman* e a maior DMS ocorreu para o extrato etanólico de *P. juliflora* após 36 horas de incubação (Tabela 1).

Acredita-se que o extrato bruto, obtido por percolação com etanol, continha oligossacarídeos, principalmente sacarose, aumentando o teor de carboidratos não fibrosos (CNF) nos extratos obtidos. Os menores valores de PG e DMS, encontrados para extrato etanólico de *S. tubulosa*, podem ser explicados pelas menores taxas de CNF presente no extrato.

O fator de partição (FP) foi continuamente maior no extrato etanólico de *S. saman* em relação aos demais tratamentos avaliados, demonstrando haver maior PG e menor DMS. Fato esse que ocorreu devido à retirada da maioria dos compostos solúveis, o que resultou em aumento na concentração de fibras (NOGUEIRA et al., 2006).

Segundo Menke et al. (1979), o fator de partição mede a eficiência da produção da massa microbiana ou eficiência de produção de proteína microbiana, logo, quanto maior o fator de partição maior é a eficiência.

Uma melhor proporção com relação a esta variação, na PG e DMS, pode ser atribuída às diferenças na composição das três espécies avaliadas, particularmente, seu teor de fibra, nitrogênio, natureza e concentração de compostos fenólicos e possibilidade da presença de outros fatores antinutricionais. Por exemplo, em estudos com métodos de produção de gases *in vitro*, têm demonstrado que os efeitos de taninos sobre a fermentação ruminal são refletidos na produção de gases (GETACHEW et al., 2002).

Tem sido relatado que algumas plantas que contêm inibidores de metano podem apresentar efeitos adversos sobre o metabolismo ruminal ou fisiologia animal, como redução na digestibilidade (BEAUCHEMIN e MCGINN, 2006). A falha de efeito sobre a degradação de nutrientes em resposta a algumas plantas que reduziram a produção de metano foi relatado por Sliwinski et al. (2002). Bodas et al. (2009) e Bunglavan et al. (2010) não observaram qualquer alteração sobre a degradabilidade da MS nem sobre a produção total de gases, apenas redução na produção de metano, quando utilizaram aditivos fitogênicos e extratos metanólicos de plantas. No presente estudo, também não se observou efeito negativo sobre a DMS, pelo contrário, a inclusão dos extratos resultou em uma melhor digestibilidade (Tabela 2).

Pode-se verificar que houve variação significativa para os parâmetros cinéticos de degradação *in vitro* dos extratos avaliados obtidos por meio do modelo de Schofield et al. (1994), apresentados na Tabela 3. Esta variação confere diferenças importantes entre os extratos etanólicos, resultando em maior ou menor digestibilidade.

O extrato de *P. juliflora* apresentou maior taxa de degradação de CNF, quando comparada aos demais extratos, isso, conseqüentemente, resultou em um maior volume final de gases. O extrato etanólico de *S. saman* apresentou volume da produção cumulativa de gases representados pelo CNF (VfCNF) similar ao do extrato de *P. juliflora*. O VfCNF corresponde ao volume de gases oriundos da fermentação da fração de digestão rápida que, por sua vez, é a principal fonte de energia para os microrganismos ruminais, sustentando seu crescimento inicial.

Tabela 3 – Comparação média dos parâmetros da cinética da digestão (mL g⁻¹ de MS) dos extratos etanólicos de farelo de vagens de *Prosopis juliflora*, *Samanea saman*, *Samanea tubulosa* e controle (DMSO;1% v/v) durante 96 horas de incubação.

Extratos Etanólicos	Parâmetros da Cinética de Digestão ¹					
	VfCNF	KdCNF	L	VfCF	KdCF	CT
Controle	73,24 ^a	0,14 ^a	5,65 ^a	105,46 ^a	0,03 ^a	176,37 ^a
<i>P. juliflora</i>	127,55 ^b	0,80 ^a	1,32 ^b	124,50 ^b	0,04 ^b	252,05 ^a
<i>S. saman</i>	113,93 ^b	0,23 ^a	2,83 ^b	132,17 ^b	0,04 ^{ab}	246,10 ^a
<i>S. tubulosa</i>	51,45 ^c	0,07 ^a	14,15 ^c	25,81 ^c	0,02 ^c	77,27 ^b

¹ Volume total de gases (mL); VfCNF e VfCF – volume de gases (mL) da degradação da fração rápida e lenta, respectivamente; KdCNF e KdCF – taxas de degradações das frações rápida e lenta (% h⁻¹), respectivamente; L – lag time (h); CT – produção total de gás (mL). Médias, na mesma coluna, seguidas de mesmas letras não diferem ($P > 0,05$) pelo teste de Tukey.

O *lag time* (L), ou seja, o tempo de colonização é um parâmetro pertinente e está intimamente relacionado à degradação da fração fibrosa (RUSSELL e WALLACE, 1997). Os resultados que demonstram um tempo maior para colonização das bactérias têm sido atribuídos ao tipo de inóculo, alimentação do animal doador, ambiente ruminal e manipulação do líquido. O maior tempo para colonização da fração fibrosa foi requerido pelo extrato etanólico de *S. tubulosa* e os menores tempos para os extratos de *P. juliflora* e *S. saman*.

Quanto às taxas de degradação dos carboidratos fibrosos, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) (Tabela 3) entre os tratamentos. Não foi encontrado na literatura qualquer estudo semelhante a este, em termos de utilização de extratos etanólicos para alimentação animal, impedindo uma discussão melhor embasada. No entanto, foi utilizado o farelo de trigo como substrato associado a todos os extratos, sabe-se que o farelo de trigo é um ingrediente que apresenta aproximadamente 23% de CNF e 53% de CF (SOARES et al., 2004), e baixos níveis de lignina, esse baixo teor de lignina facilita o acesso de microrganismos aos carboidratos fibrosos, que podem ter sido favorecido, ainda pela utilização dos extratos, especialmente os extratos etanólicos de *P. juliflora* e *S. saman* ($P < 0,05$), que apresentaram as maiores taxas de degradação.

A maior produção de gases proveniente da degradação de CF foi obtida pelo farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *S. saman*, podendo sugerir que a fração B2 apresenta boa fermentação ruminal. Por outro lado, a menor produção de gases na degradação de CF (VfCF) foi no tratamento utilizando extrato de *S. tubulosa*, que pode estar associado ao alto teor de lignina presente no farelo do qual se obteve o extrato (Tabela 1). Esta estrutura está inteiramente correlacionada à digestibilidade do alimento e, neste caso, possivelmente os microrganismos colonizaram partículas do alimento, mas foram detidos por uma estrutura lignificada, reduzindo a taxa de degradação e, por conseguinte, a produção de gases.

As diferenças na produção de gases, decorrentes das degradações de CNF e CF, podem ser visualizadas individualmente para cada tratamento na Figura 1.

A curva de produção de gases da matéria seca de cada tratamento está apresentada na Figura 2, podem-se verificar diferenças dos tratamentos sobre o volume final total de gases. O tratamento com farelo de trigo, associado ao extrato etanólico de *S. tubulosa*, mostrou-se eficiente em inibir a produção final de gases, enquanto os tratamentos com extrato de *P. juliflora* e *S. saman* não resultaram em menores valores em relação ao controle. Isso possivelmente se deve ao fato desses extratos apresentarem diferentes teores de CNF, fornecendo inicialmente carboidratos solúveis prontamente disponíveis para os processos digestivos. Sabe-se, ainda, que os CF são capazes de gerar mais gases que CNF por unidade metabolizada (JOHNSON e JOHNSON, 1995).

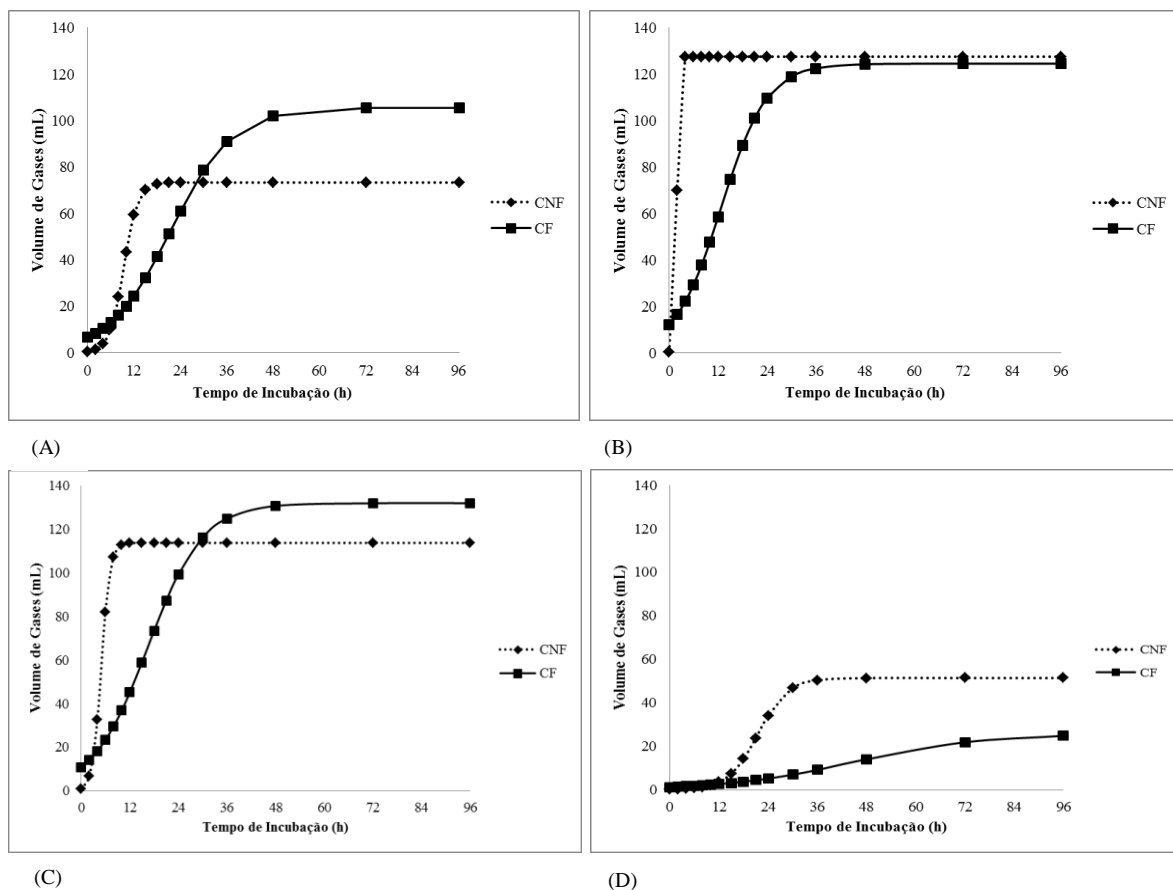


Figura 1 – Produção de gases oriunda da degradação de CNF e CF do farelo de trigo associado ao: (A) DMSO; (B) extrato etanólico de *P. juliflora*; (C) extrato etanólico de *S. saman*; (D) extrato etanólico de *S. tubulosa* em função do tempo de incubação.

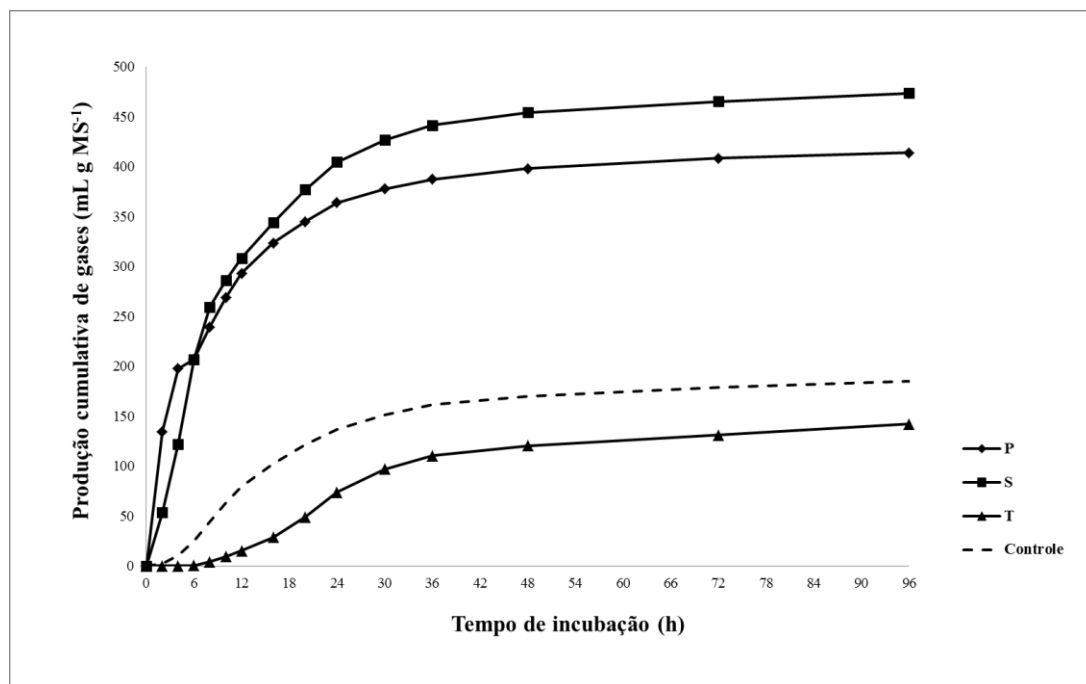


Figura 2 – Produção total de gases em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao: (Controle) DMSO; (P) extrato etanólico de *P. juliflora*; (S) extrato etanólico de *S. saman*; (T) extrato etanólico de *S. tubulosa*.

As quantidades de metano (CH₄) produzidas pelo animal podem estar relacionadas com a qualidade do alimento ingerido, em geral, animais que consomem alimentos altamente digestíveis reduzem a emissão de metano, porque o alimento permanece pouco tempo no rúmen (AAFC, 2003; PEDREIRA e PRIMAVERSI, 2011). As taxas de passagem aumentando podem, possivelmente, definir eventuais reduções de metano ruminal (HINDRICHSEN et al., 2006). Além disso, a fermentação anaeróbia no rúmen de carboidratos rapidamente fermentáveis, efetuado pela população microbiana, pode aumentar a produção de AGV. Se a produção de AGV é maior do que a absorção, o pH no rúmen vai cair, levando a perturbação da microbiota ruminal (PLAIZIER et al., 2008). E, ainda nesse processo fermentativo, são produzidos dióxido de carbono e metano, em maior ou menor quantidade, dependendo da concentração e proporções relativas dos ácidos produzidos.

Houve efeito da interação (horas de incubação vs extratos etanólicos de leguminosas tropicais) sobre a quantificação de metano. Quando submetida à análise de regressão, verificou-se efeito quadrático em função do tempo de incubação (Figura 3).

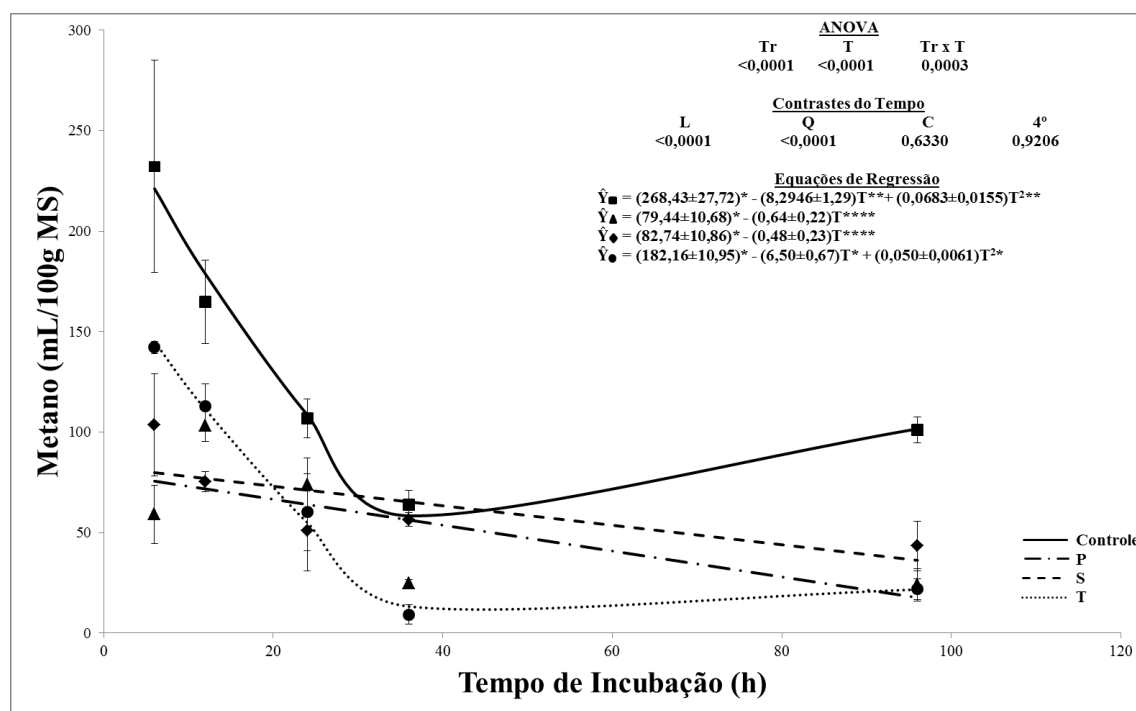


Figura 3 – Comportamento da produção de metano, expressa em mL/ 100g de matéria seca verdadeiramente degradada, em função do tempo de incubação do farelo de trigo associado ao: DMSO (Controle); extrato etanólico de *P. juliflora* (P); extrato etanólico de *S. saman* (S); extrato etanólico de *S. tubulosa* (T).

*significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; *** significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; ****significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

A redução na produção de metano (mL/ 100g de matéria seca verdadeiramente degradada) foi induzida por todos os tratamentos. Em comparação com o tratamento controle (farelo de trigo associado ao DMSO), a inclusão dos extratos etanólicos de *P. juliflora* e *S. tubulosa* contribuíram para uma melhor redução na proporção de metano do conteúdo ruminal até às 36h após incubação. Contudo, é possível observar que a adição do extrato etanólico de *P. juliflora*, como substrato associado ao farelo de trigo, resultou em produção de gases com menor proporção de metano e, conseqüentemente, maior produção de CO₂, o que pode sugerir que, mesmo havendo disponibilidade de CO₂, não houve transformação acentuada em CH₄.

O extrato etanólico de *S. saman* também proporcionou menor produção de metano, entretanto, entre os tratamentos em que foram adicionados extratos, observou-se que o extrato de *S. saman* foi o que menos contribuiu para a redução da produção de metano. Este fato pode ser explicado pelo dendograma Jaccard, gerado a partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE (Figura 5), em que as amostras referentes ao tratamento com o mencionado extrato apresentam alta similaridade (maior que 50%), concluindo que não houve muitas modificações sobre a diversidade dessa população durante o período de incubação.

Bunglavan et al. (2010), analisando extratos metanólicos de diversas plantas, observaram que o extrato de *Acacia concinna*, leguminosa da subfamília Mimosoideae, foi a planta que mais reduziu a produção de metano entre as espécies avaliadas. Sihori et al. (2012), avaliando extratos metanólicos de três plantas, *Lawsonia inermis* (urucum), *Myristica fragans* (noz moscada) e *Capsicum annum* (pimenta), referiram-se ao extrato de *Myristica fragans* como sendo a mais eficiente na redução de metano, quando comparado ao controle. Igualmente, Patra et al. (2006) também relataram que extrato metanólico de sementes de *Terminalia chebula* e extratos metanólico, etanólico e aquoso de *Allium satium* (alho) reduziram significativamente a produção de metano no líquido ruminal de búfalos.

A análise de Componentes Principais (PCA) permitiu redimensionar o espaço das informações originais em um novo espaço formado por duas variáveis latentes denominadas de Componentes Principais (CP1 e CP2), criadas por combinações lineares das variáveis originais na região que deteve a maior concentração da variância original. Essas duas novas variáveis, colocadas ortogonalmente, geraram uma distribuição bidimensional das amostras, conforme se observa na Figura 4.

A análise Biplot, aplicada às Componentes Principais, explicou 99,1% (CP 1 = 69,8% e CP 2 = 29,3%) da variabilidade total observada nos dados de consumo de nutrientes (Figura 4). Na Tabela 4 estão apresentadas as correlações entre cada variável e seus respectivos componentes principais, indicando aquelas variáveis que mais discriminaram em cada eixo. A CP 1 (eixo horizontal ou eixo X) explicou 69,8% da variação total, mostrando uma clara discriminação dos tratamentos em que foram incluídos extrato de *P. juliflora* e *S. saman* em relação aos demais tratamentos.

As variáveis com correlações positivas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras à direita em CP1 e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras à esquerda em CP1 (Figura 4) (Tabela 4). Assim, as variáveis VfCNF, CT, FP, VfCF e DMS, nessa ordem, foram responsáveis pela discriminação dos tratamentos com farelo de trigo associado aos extratos de *P. juliflora* e *S. saman*, enquanto que as variáveis Lag e CH4 foram responsáveis pela discriminação dos tratamentos com farelo de trigo associado ao DMSO (Controle) e ao extrato etanólico de *S. tubulosa*. Essas informações confirmam o que foi discutido anteriormente, que os extratos alteraram a fermentação do farelo de trigo, sendo essas diferenças mais acentuadas com a adição dos extratos etanólicos de *P. juliflora* e *S. saman*, em CP 1.

Quanto a CP 2 (eixo vertical ou eixo Y), as variáveis com correlações positivas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras acima do zero em CP2 e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras abaixo do zero em CP2. Assim, as variáveis CH4 e VfCF foram responsáveis pela discriminação do tratamento controle enquanto que as variáveis DMS e Lag, nessa ordem, foram discriminantes para os tratamentos com farelo de trigo associado aos extratos etanólicos.

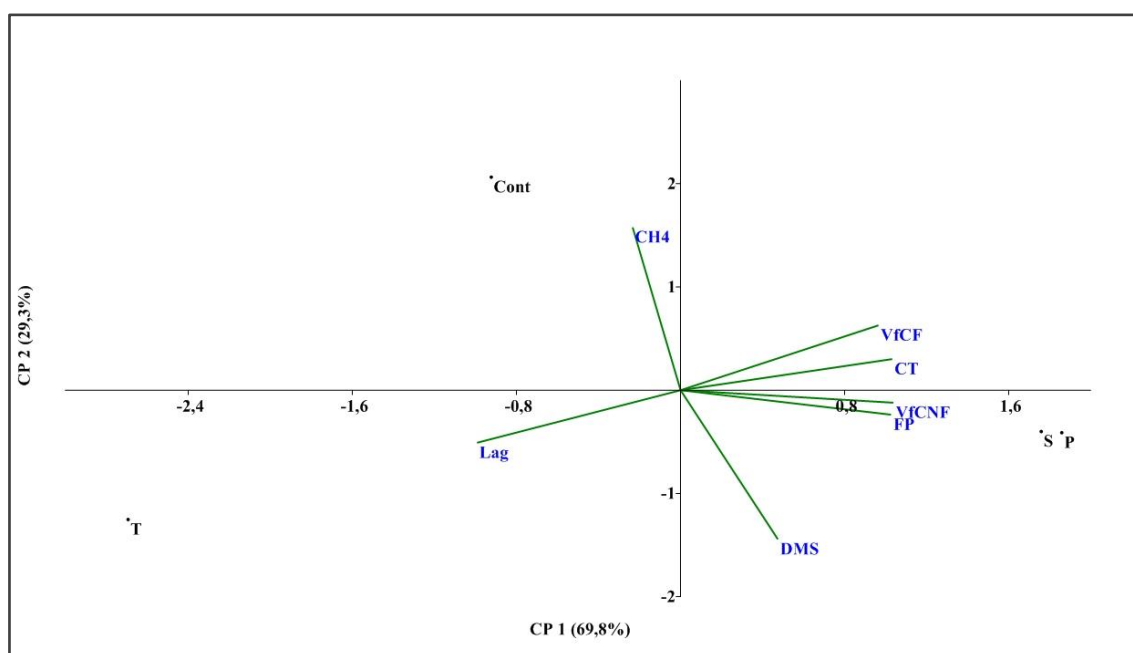


Figura 4 – Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e dos parâmetros de cinética da digestão, degradabilidade verdadeira da matéria seca (DMS) e metano (CH4).

Em que: P – Extrato Etanólico de *Prosopis juliflora*; S – Extrato Etanólico de *Samanea saman*; T – Extrato Etanólico de *Samanea tubulosa*; Cont – Farelo de Trigo associado ao DMSO. VfCNF e VfCF – volume de gases (mL) da degradação da fração rápida e lenta, respectivamente; Lag – lag time (h); CT – produção total de gás (mL); FP – fator de partição.

Tabela 4 – Correlação entre variáveis dos parâmetros de cinética da digestão, degradabilidade verdadeira da matéria seca (DMS) e metano (CH₄) e cada componente principal (CP).

	DMS	CH ₄	VfCNF	VfCF	Lag	CT	FP
CP 1	0,45	-0,22	0,99	0,91	-0,94	0,98	0,97
CP 2	-0,89	0,97	-0,07	0,39	-0,31	0,18	-0,14

VfCNF e VfCF – volume de gases (mL) da degradação da fração rápida e lenta, respectivamente; Lag – *lag time* (h); CT – produção total de gás (mL); FP – fator de partição.

Johnson e Johnson (1995) afirmaram que a digestão de fibra de parede celular aumenta a produção de metano, aumentando a quantidade de acetato produzida, em relação ao propionato. O aumento da produção de metano é devido à fermentação de acetato, que fornece um grupo metila para metanogênese (FERRY, 1992). Isso é percebido na PCA, principalmente em CP 2, que houve correlação entre o volume de gases da degradação da fração lenta (VfCF) e a produção de metano, que demonstrou maiores teores no tratamento controle.

O que pode ter acontecido foi, justamente, os extratos terem fornecido oligossacarídeos para a fermentação, principalmente sacarose, e isso ter promovido formação de propionato e butirato, que servem como dissipadores de hidrogênio (NAGARAJA et al., 1997), contribuindo para uma redução no pH do rúmen, elevando a uma diminuição da metanogênese, percebido isso mais notadamente para os tratamentos com extratos etanólicos de *P. juliflora* e *S. saman*.

Produção total de gases sob condições *in vitro* por conta própria não reflete o grau de utilização eficiente do substrato. A produção alta de gases total indica que a maioria do substrato foi para a produção de gases, reduzindo, desse modo, a produção de AGV e outros produtos finais benéficos. A produção de gases pode igualmente ser baixa, devido à fermentação inadequada de substrato ou ao fato de que a fermentação ocorreu em favor de AGV em vez de gases (CZERKAWSKI e BRECKENRIDGE, 1977). Assim, avaliar a produção total de gases sozinho realmente não indica a potência do extrato utilizado em trazer uma mudança na fermentação, como mencionou Bunğlavan et al. (2010).

A Figura 5 mostra o perfil da comunidade de arqueas, obtido por PCR-DGGE, após incubação de fluido ruminal bovino, tendo como substrato o farelo de trigo associado aos extratos etanólicos de *P. juliflora*, *S. saman* e *S. tubulosa*. Pode-se observar que houve diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR para os diferentes extratos etanólicos (Figura 5), existindo apenas uma banda compartilhada entre todos os tratamentos e tempos de incubação (Figura 5) (Figura 7). Os padrões de bandas, obtidos mediante a DGGE, foram utilizados para auxiliar na análise da estrutura das comunidades de microrganismos. A estimativa foi realizada pela análise de agrupamento do tipo *cluster*, a partir de uma matriz de dados de presença e ausência das bandas verificadas em cada amostra (Figura 5).

Essas alterações podem ser melhor visualizadas nas Figura 6 e Figura 7, nas quais se observam a riqueza de bandas (espécies) que podem ser compartilhadas ou específicas de cada “grupo amostrado” e as alterações em função do tempo de incubação.

As arqueas metanogênicas são afetadas pelas mudanças na alimentação animal. Por exemplo, aumento na taxa de fermentação, decréscimo do pH e da relação acetato:propionato são fatores que conduzem à redução da quantidade de H₂ disponível para a formação de metano. Dessa maneira, há menor produção de metano e, em consequência disso, aumenta o nível de energia metabolizável disponível para o animal.

Para o farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *P. juliflora*, percebe-se, inicialmente, de 6 às 12h após a incubação, um número reduzido de bandas. Isso resultou em produção de gases com menor proporção de metano (Figura 3) e maior produção de gás carbônico (Tabela 2), o que pode indicar que, mesmo havendo disponibilidade de CO₂, não houve transformação acentuada deste em CH₄, havendo quatro hipóteses para este baixo aproveitamento: 1) presença de poucas arqueas metanogênicas, devido à diminuição do pH ruminal em relação ao tratamento controle; 2) essa redução de pH pode ter afetado a população de bactérias (Capítulo 2), isso pode ter levado a uma indisponibilidade de H₂. A pouca liberação de H₂ no ambiente *in vitro*, motivado por vias estequiométricas que favorecem a produção de propionato e não de acetato; 3) presença de compostos antimetanogênicos nesse extrato, como taninos, saponinas ou alcaloides que, possivelmente, pode ter reduzido esta comunidade; 4) redução na comunidade de protozoários pode ter ocorrido neste tratamento, inicialmente, o que levou a uma redução das metanogênicas associadas a estes microrganismos por aderência ou endossimbiose (NEWBOLD et al., 1995; TOKURA et al., 1999; HEGARTY et al., 2008).

No entanto, ao avaliar a comunidade de arqueas, após 12h de incubação (Figura 6), nota-se elevação no número de espécies, isso pode ser atribuído ao decréscimo dos fatores antimetanogênicos no meio, porém, essas espécies ainda apresentaram inabilidade para produção de CH₄, visto que, nesse período ainda se observa redução nas concentrações de metano (Figura 3).

Sobre a população de arqueas analisada, quando se forneceu extrato etanólico de *S. saman* (Figura 5) (Figura 6), percebe-se que houve uma redução das metanogênicas até 6h após a incubação, provavelmente, devido à redução de pH e de bactérias fornecedoras de H₂, entretanto, a produção de metano foi a mais alta neste horário. Pode-se sugerir que este extrato foi capaz de inibir a metanogênese (Figura 3) sem efeito direto sobre as metanogênicas, isso pode ser comprovado pela alta similaridade (maior que 50%) encontrada pelo dendograma Jaccard. Esta observação corrobora com Zeleke et al. (2006), que afirmaram que a leguminosa *S. saman* não apresenta propriedades antimetanogênica.

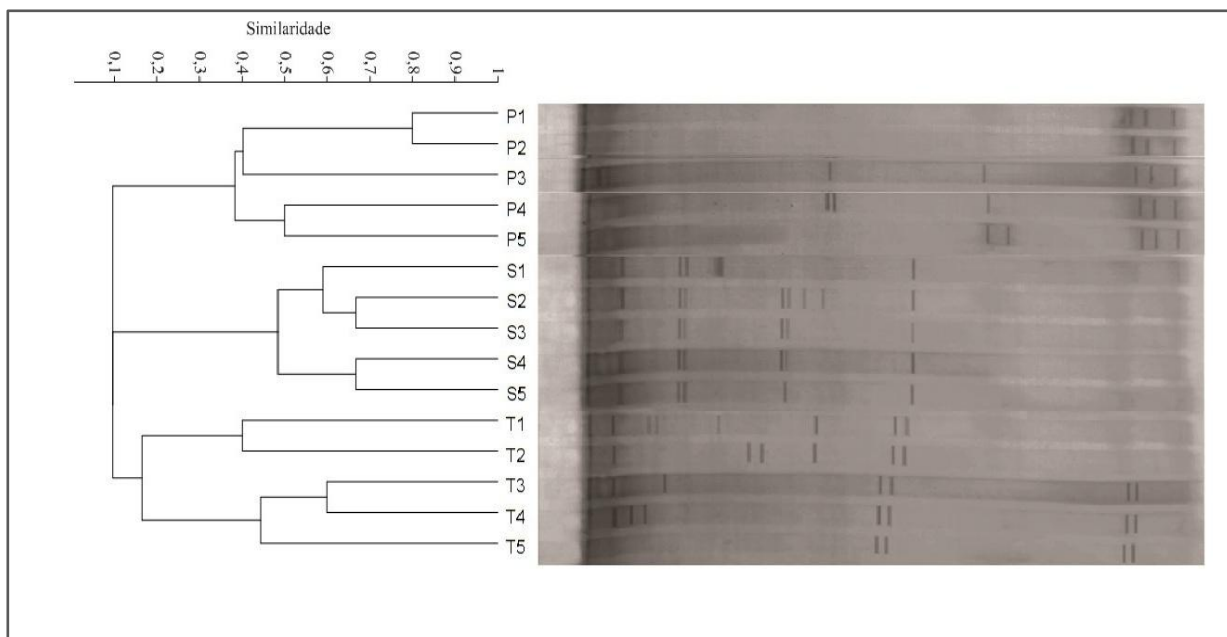


Figura 5 - Dendrograma Jaccard gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com iniciadores específicos para arqueas (1100 e 1400 do 16S rRNA). Em que, P – Extrato Etanólico de *Prosopis juliflora*; S – Extrato Etanólico de *Samanea saman*; T - Extrato Etanólico de *Samanea tubulosa*; 1-5 equivalem aos tempos de incubação (6, 12, 24, 36 e 96 h).

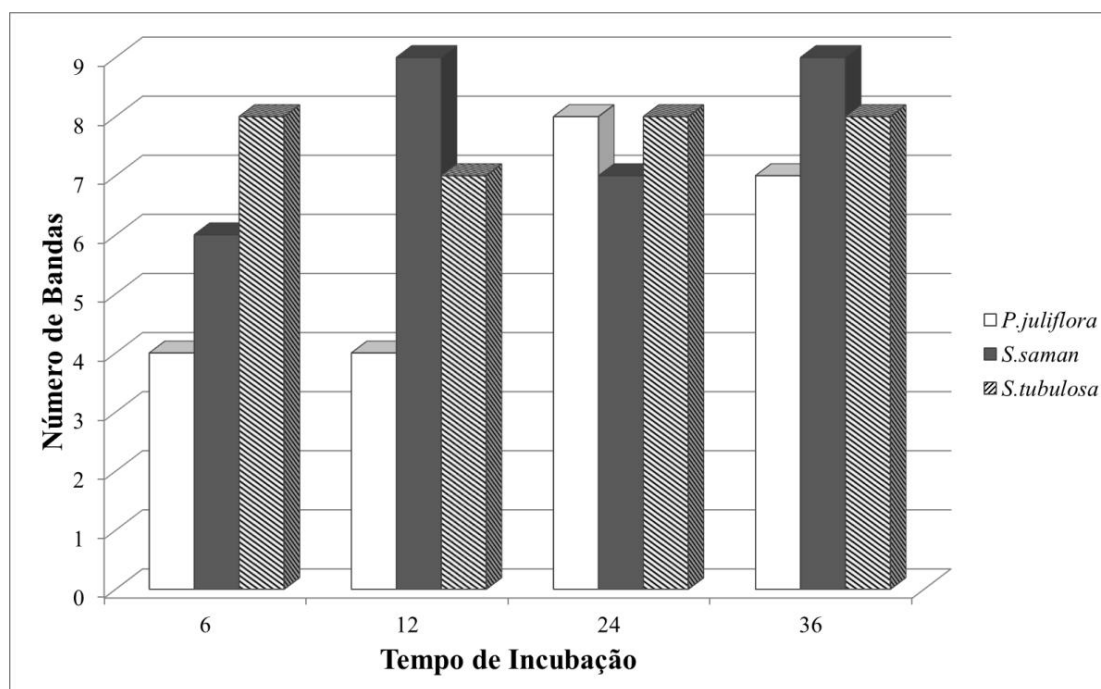


Figura 6 – Riqueza de bandas para o domínio *Archaea* considerando os tempos de incubação (h) com adição dos extratos etanólicos de *Prosopis juliflora*; *Samanea saman* e *Samanea tubulosa*.

Ao avaliar o padrão de bandas para o tratamento com farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *S. tubulosa* (Figura 5), observou-se baixa similaridade, aproximadamente 20%, entre as amostras em que foi incubado esse extrato, no entanto, não se observou redução no

número de bandas em função do tempo. Nesse tratamento, houve uma proporção de metano inferior ao tratamento controle, mas superior aos tratamentos com os extratos de *P. juliflora* e *S. saman* (Figura 3). Sugere-se que as arqueas metanogênicas responsáveis pela alta atividade fermentativa estavam presentes até 12 horas após a incubação, sendo em seguida eliminadas do meio.

O diagrama de Venn apresentado na Figura 7 evidencia claramente o agrupamento de bandas (espécies) que podem ser compartilhadas ou específicas para cada tratamento com extrato etanólico. Observou-se uma menor quantidade de bandas compartilhadas entre os tratamentos e maiores números de bandas raras, confirmando que os extratos etanólicos modificam a diversidade de arqueas metanogênicas. Os extratos de *S. saman* e *S. tubulosa* compartilham exclusivamente 3 bandas, demonstrando, assim, similaridade em termos de distribuição de espécies entre os dois extratos. O extrato etanólico de *S. tubulosa* apresentou o maior número de espécies (18 bandas), seguido do extrato etanólico de *S. saman* e *P. juliflora*, 13 e 10 bandas, respectivamente. Isso refletiu sobre a produção de metano, na qual a média dos tratamentos, sem considerar o tempo de incubação, obedeceu a mesma sequência, 33,25; 26,83 e 25,00 mL/ 100g MS verdadeiramente degradada para o extrato de *S. tubulosa*, de *S. saman* e *P. juliflora*, respectivamente.

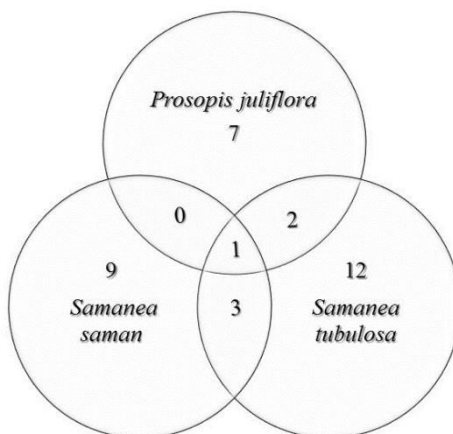


Figura 7 – Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para arqueas.

4 CONCLUSÃO

Este estudo sugere que os extratos etanólicos de leguminosas tropicais têm grande potencial para serem utilizados como aditivos alimentares e foram eficientes para mitigação da emissão de metano em ruminantes.

A microbiota estudada revelou que a redução na produção de metano pode ser atribuída à diminuição de substrato fermentável em vez do efeito direto sobre as metanogênicas, como foi observado para o tratamento de farelo de trigo associado ao extrato etanólico de *Samanea tubulosa*.

Mais pesquisas com o uso de extratos de leguminosas tropicais na dieta de ruminantes são necessárias para avaliação do desempenho animal, análise de custo/benefício, bem como qualidade do produto.

5 REFERÊNCIAS

- AGRICULTURAL AND AGRI-FOOD CANADA – AAFC. **Estimates of emissions: methane**. Disponível em: <<http://www.agr.ca/research/Healthy_Air>>. Acesso em: Jul 2003.
- ADESOGAN AT, KRUEGER NK, KIM SC. A novel wireless automated system for measuring fermentation gas production kinetics of feeds and its application to feed characterization. **Animal Feed Science and Technology**. v.123-124, p.211-223. 2005.
- BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil and canola oil. **Journal Animal Science**. v.84, p.1489-1496. 2006.
- BHATTA, R.; VAITHIYANATHAN, S.; SINGH, N.P.; VERMA, D.L. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. **Small Ruminant Research**. v.67, p. 75-83. 2007.
- BLÜMMEL, M., MAKKAR, H.P.S., BECKER K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**. v.77, p.24-34. 1997.
- BODAS, R.; FRUTOS, P.; GIRÁLDEZ, F.J.; HERVÁS, G.; LÓPEZ, S. Effect of sodium bicarbonate supplementation on feed intake, digestibility, digesta kinetics, nitrogen balance and ruminal fermentation in young fattening lambs. **Spanish Journal of Agricultural Research**. v.7, n.2, p.330-341. 2009.
- BUNGLAVAN, S.J.; VALLI, C.; RAMACHANDRAN, M.; BALAKRISHNAN, V. Effect of supplementation of herbal extracts on methanogenesis in ruminants. **Livestock Research for Rural Development**. v.22, n.11, 216. 2010.
- CASEWELL, M., FRIIS, C., MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.52, p.159–161. 2003.
- CZERKAWSKI, J.W.; BRECKENRIDGE, G. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). **British Journal of Nutrition**. v.38, n.3, p.371-384. 1977.
- EC, 2003, Regulation EC No 1831/2003 of the European Parliament and Council of 22 September on additives for use in animal nutrition. Official J Eur Commun. L268, 29-43.
- FERRY, J.G. Methane from acetate. **Journal of Bacteriology**. v.174, n.17, p.5489-5495. 1992.
- FIEVEZ, V., BABAYEMI, O.J.; DEMEYER, D. Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. **Animal Feed Science and Technology**. v.123-124, p.197-210. 2005.
- FRANCE, J.; LOPEZ, S.; KEBREAD, E.; BANNINK, A.; DHANOA, M.S.; DIJKSTRA, J. A general compartmental model for interpreting gas production profiles. **Animal Feed Science and Technology**. v.123-124, p.473-485. 2005.
- FIGUEIREDO, M.P.; MAURICIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; REBOUÇAS, G.M.N.; MOREIRA, G.R.; SOUZA, L.F. Determinação entre pressão e volume através da

- fermentação da raiz de mandioca tratada com ureia, feno de Tifton 85 e silagem de milho para a instalação da técnica *in vitro* de produção de gases. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA*, 40., 2003, Santa Maria. **Anais...** Rio Grande do Sul: Infovia, 2003, CD-ROM. Nutrição de ruminantes. Nr-062.
- GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **Journal of Agricultural Science**. v.139, p.341-352, 2002.
- GETACHEW, G.; DEPETERS, E.J.; ROBINSON, P.H.; FADEL, J.G. Use of an *in vitro* ruman gas production technique to evaluate microbial fermentation of ruminant feeds and its impact on fermentation products. **Animal Feed Science and Technology**. v.123-124, p.547-559. 2005.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. **Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, D.C.: USDA, 1970. (Agricultural Handbook, 379).
- GREATHEAD, H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.62, p.279-290. 2003.
- HART, K.J.; YÁÑEZ-RUIZ, D.R.; DUVAL, S.M.; MCEWAN, N.R.; NEWBOLD, C.J. Plant extracts manipulate rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**.v.147, p.8-35. 2008.
- HEGARTY, R.S.; BIRD, S.H.; VANSELOW, B.A.; WOODGATE, R. Effects of the absence of protozoa from birth or from weaning on the growth and methane production of lambs. **British Journal of Nutrition**. v.100, p.1220-1227. 2008.
- HINDRICHSEN, I.K.; WETTSTEIN, H.-R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Methane emission, nutrient degradation and nitrogen turnover in dairy cows and their slurry at different milk production scenarios with and without concentrate supplementation. **Agriculture, Ecosystems & Environment**. v.113, p.150-161. 2006.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**. v.37, p.547-579. 1901.
- JANCÍK, F.; KOUKOLOVA; V.; HOMOLKA, P. Ruminal degradability of dry matter and neutral detergent fibre of grass. **Czech Journal of Animal Science**. v.9, p.359-371. 2010.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal Animal Science**. v.73, n.8, p.2483-2492, 1995.
- JOUANY, J.P.; MORGAVI, D.P. Use of “natural” products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **Animal**. v.1, n.10, pp. 1443-1466. 2007.
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. Van.Structural diversity of microbiol.Communities in arable soils of a heavily industrialized area determined by PCR-DGGE fingerprint and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**. v. 17, p. 31-42. 2001.
- KUDO, Y; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. **FEMS Microbiology Ecology**. v.22, p.39-48.1997.

- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. **SAS[®] system for mixed models**. Cary, 633p.1996.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. et al. **SAS[®] system for mixed models**. 2nd Edition, Cary, 824p. 2006.
- MAKKAR H.P.S. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. **Animal Feed Science and Technology**. v.123-124, p.291-302. 2005.
- 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 Thecnology**. v.79, p.321-330. 1999.
- MENKE, K.H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A. STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHENEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedngstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. **Journal of Agricultural Science**. v. 93, p.217-222. 1979.
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentatiton. *In*: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. London. Chapmam and Hall, 2 ed., 719 p. 1997.
- NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; MCINTOSH, F.M. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. **Journal Animal Science**. v.73, p.1811–1818. 1995.
- NOGUEIRA, U.T.; MAURICIO, R.M.; GONÇALVES, L.C. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizando a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.4, p.633-641.2006.
- PATRA, A.K.; KAMRA, D.N.; AGARWAL, N. Effect of plant extract on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. **Animal Feed Science and Technology**. v.128, p.276-291. 2006.
- PEDREIRA, M.S.; PRIMAVESI, O. **Quantificação das emissões e nutrição para redução da produção de metano por bovinos**. *In*: LIMA, R.C.C.; CAVALCANTE, A.M.B.; MARIN, A.M.P. (ed.) Desertificação e Mudanças Climáticas no Semiárido Brasileiro. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Instituto Nacional do Semiárido – INSA. Campina Grande-Paraíba. 2011.
- PEN, B.; SAR, C.; MWENYA, B.; TAKAHASHI, J. Effects of *Quillaja saponaria* extract alone or in combination with *Yucca schidigera* extract on ruminal fermentation and methanogenesis *in vitro*. **Animal Science Journal**. v.79, p. 193-199. 2008.
- PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O.; GOZHO, G.N.; MCBRIDE, B.W. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. **The Veterinary Journal**. v.126, n.1, p.21-31. 2008.
- RUSSELL, J.B.; WALLACE, R.J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. *In*: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (eds.). **The Rumen Microbial Ecosystem**. Chapman & Hall, London, pp.246.

- 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.
- SCHOFIELD, P., PITT, R.E. e PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**. v.72, p.2980-2991. 1994.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G + C - rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of National Academy of Science**. v.86, n.1, p.232-236. 1989.
- SIHORI, S.K.; GOEL, N.; PANDEY, P. Efficacy of diferente methanolic plant extracts on anti-methanogenesis, rumen fermentation and gas production kinetics *in vitro*. **Open Veterinary Journal**. v.2, p.72-77. 2012.
- SLIWINSKI, B.J.; SOLIVA, C.R.; MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**. v.101, p.101-114. 2002.
- SOARES, C.A.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; MENDONÇA, S.S.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite de vacas alimentadas com farelo de trigo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.6, p.2161-2169. 2004.
- THEODOROU, 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 kinetic of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**. v.48, p.185-197. 1994.
- TOKURA, M.; CHANGAN, I.; USHIDA, K.; KOJIMA, Y. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. **Current Microbiology**. v.39, p.123-128. 1999.
- TSAI, Y.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2292-2295. 1992.
- UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY – US EPA. **Evaluating Ruminant Livestock Efficiency Projects and Programs**. In: Peer Review Draft. Washington, D.C, 2000, 48p.
- YANG, S.; CARLSON, K. Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. **Water Research**. v.38, p.3155-3166. 2004.
- ZELEKE, A.B.; CLÉMENT, C.; HESS, H.D.; KREUZER, M.; SOLIVA, C.R. Effect of foliage from multi-purpose trees and a leguminous crop residue on *in vitro* methanogenesis and ruminal N use. **Internacional Congress Series**. v.1293, p.168-171. 2006.

ANEXOS

ANEXO A



Prosopis juliflora. Em destaque vagem característica da espécie.



Prosopis juliflora. Em destaque vagem característica da espécie.

Fonte: http://www.ct.ufpb.br/laboratorios/lpfd/index.php?option=com_content&view=article&id=50&Itemid=68

ANEXO B



Samanea saman. Em destaque tronco característico do gênero.



Samanea saman. Em destaque inflorescência característica do gênero.

Fonte: <http://www.clickmudas.com.br/mudas-de-arvore-da-chuva-isamanea-saman-i.html>



Samanea saman. Em destaque vagens características da espécie.

Fonte: <http://www.flickr.com/photos/adaduitokla/7036136659/>

ANEXO C



Samanea tubulosa. Em destaque uma exsicata mostrando algumas características da espécie.

Fonte: http://eol.org/data_objects/18415383

ANEXO D

EXPERIMENTO in vivo “CABRAS FISTULADAS”

Farelo de Algaroba na Alimentação de Cabras Mestiças Anglo Nubianas: Comportamento Ingestivo, Parâmetros Ruminais e Diversidade Ruminal de Bactérias e Arqueas Metanogênicas

Mesquite Pod Meal Feed Crossbred Anglo Nubian Goats: Ingestive Behavior, Ruminant Parameters and Molecular Diversity of Rumen Bacteria and Methanogens

RESUMO

ARGÔLO, L.S. **Farelo de Algaroba na Alimentação de Cabras Mestiças Anglo Nubianas: Comportamento Ingestivo, Parâmetros Ruminais e Diversidade Ruminal de Bactérias e Arqueas Metanogênicas.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Tese - Doutorado em Zootecnia - Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos da adição de farelo de vagem de algaroba (FVA) em substituição ao milho grão moído no concentrado sobre os parâmetros ruminais (pH, N-NH₃ e AGV) e sobre a diversidade microbiana ruminal. Para o experimento, foram utilizadas 4 cabras adultas, com aproximadamente 31 kg de PC, distribuídas em quadrado latino 4x4. Foram utilizados níveis de FVA de 0, 33,3, 66,7 e 100% da matéria natural do concentrado, em dietas isonitrogenadas, tendo como base volumosa a silagem de capim-elefante, na proporção de 43%. Os consumos de MS, PB, FDN e FDA não foram influenciados ($P>0,05$) pelos níveis de FVA. Estimou-se o consumo máximo de CNF (kg/dia) e mínimo de FDN (% de MS) nos respectivos níveis de 35,4% e de 27,0% de FVA. O consumo de EE apresentou ajuste linear decrescente para adição de FVA. O tempo despendido para alimentação não sofreu influência da dieta, mas os tempos gastos para ruminação e ócio reduziram linearmente com o aumento dos níveis de FVA. Houve efeito significativo ($P<0,05$) dos parâmetros ruminais em função dos níveis de substituição do milho pelo FVA. O pH, de acordo com a equação ajustada, variou de forma linear crescente em função dos níveis de FVA e manteve-se em faixa adequada, entre 6,32 e 6,85, durante 8 horas após alimentação. Para a concentração de amônia ruminal, observou-se um pico de produção de 14,01 mmol/L de fluido ruminal com 2 horas após alimentação da manhã, e as concentrações de acetato, propionato e butirato não apresentaram qualquer efeito, embora a adição de 33,6% de FVA resultou no menor valor estimado para a razão acetato:propionato, que foi 2,87. Para a análise molecular da diversidade microbiana, o líquido ruminal foi coletado 4 h após a alimentação matinal no 14º dia de cada período experimental. A diversidade genética bacteriana e de arqueas foi determinada por meio da DGGE dos produtos de PCR da região V3 e 1100-1400 do 16S rDNA, respectivamente. As análises deste experimento mostraram variações nos padrões de bandas do gel, indicando alterações das populações estudadas em função dos tratamentos, havendo uma redução de metanogênicas com a inclusão de até 66,7% de FVA.

Palavras-chave: Análise multivariada, comportamento ingestivo, parâmetros ruminais, PCR-DGGE, *Prosopis juliflora*.

*Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mara Lúcia Albuquerque Pereira, UESB e Coorientadores: Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias, UESB, Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo, UESB e Prof. Dr. Ronan Batista, UESB.

ABSTRACT

ARGÔLO, L.S. **Mesquite Pod Meal in Feed Crossbred Anglo Nubian Goats: Ingestive Behavior, Ruminal Parameters and Molecular Diversity of Ruminal Bacteria and Methanogens.** Itapetinga-BA: UESB, 2012. (Thesis – Doctor Degree in Animal Science – Production of Ruminant).*

The objective of this study was to evaluate the effects of adding mesquite pod meal (MPM) replacing corn grain milled in concentrate on ruminal parameters (pH, NH₃-N and VFA) and on ruminal microbial diversity. For the experiment we used four adult goats, with approximately 31 kg BW, divided into 4x4 Latin square. We used MPM levels of 0, 33.3, 66.7 and 100% natural matter of concentrate in isonitrogenous diets, based on the massive elephant grass silage at a ratio of 43%. The DM, CP, NDF and ADF were not affected ($P>0.05$) by the MPM. We estimated the maximal non-fiber carbohydrates (kg/ day) and minimum NDF (% DM) at the respective levels of 35.4% and 27.0% of MPM. EE intake showed a decreasing linear fit to the addition of MPM. The time spent feeding was not affected by diet, but for the time spent ruminating and idle declined linearly with increasing levels of MPM. Significant effects ($P<0.05$) ruminal parameters depending on the levels of substitution of corn by MPM. The pH according to the equation adjusted, varied linearly as a function of increasing levels of MPM and remained at adequate range between 6.32 and 6.85 for 8 hours after feeding. For ruminal ammonia concentration was observed a peak production of 14.01 mmol/ L of ruminal fluid to 2 hours after morning feeding, and the concentrations of acetate, propionate and butyrate did not show any effect, while the addition of 33.6% of MPM resulted in lower estimated value for the ratio acetate: propionate ratio, which was 2.87. For the molecular analysis of microbial diversity, the rumen fluid was collected 4 h after the morning feeding on day 14 of each experimental period. Genetic diversity of bacterial and archaeal was determined by DGGE of PCR products of the V3 region and 1100-1400 of 16S rDNA, respectively. The analyzes of this experiment showed variation in band patterns of the gel, indicating changes in the populations studied as a function of treatment, with a reduction of methanogenic with the addition of up to 66.7% of MPM.

Keywords: Ingestive behavior, multivariate analysis, PCR-DGGE, *Prosopis juliflora*, ruminal fermentation.

* Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, *D. Sc.*, UESB; and Co-advisers: João Carlos Teixeira Dias, *D. Sc.*, UESB; Mauro Pereira de Figueiredo *D. Sc.*, UESB; and Ronan Batista, *PhD.*, UESB.

1 INTRODUÇÃO

Muitas são as conclusões de que os ecossistemas microbianos são notavelmente complexos e diversificados, o que limita as abordagens sobre a ecologia microbiana, incluindo o microbioma ruminal caracterizado pela alta densidade populacional, ampla diversidade e interações complexas. Esta biodiversidade, bem como o número total de microrganismos no trato gastrointestinal (TGI) são determinados por fatores intrínsecos como o local do TGI ou genético, e por fatores extrínsecos como a dieta e saúde do animal (VAUGHAN et al., 2000), além disso, o crescimento microbiano no rúmen é influenciado pela interação dos fatores químicos, fisiológicos e nutricionais.

O estudo da diversidade microbiana ruminal tenta compreender as transformações que ocorrem no rúmen, explicar a natureza da fermentação e a maneira como isso afeta a nutrição do ruminante, além das flutuações no grau do fornecimento do alimento, por exemplo, mudanças nos níveis de um concentrado. A qualidade e a quantidade dos produtos de fermentação são dependentes do tipo e da atividade dos microrganismos que compõem a população, que, por sua vez, dependem da dieta.

Nos aspectos nutricionais, existe a necessidade da busca de alimentos alternativos em substituição àqueles comumente utilizados na dieta de ruminantes. Segundo Lima (2005), a algarobeira [*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.], introduzida no Nordeste do Brasil na década de 1940 com a finalidade de oferecer alimentos aos animais no período da seca, dispõe de uma alta palatabilidade e produtividade como forragem. Produz grande quantidade de vagens de boa digestibilidade, apresenta em sua composição química de 25-28% de glicose, 11-17% de amido, 7-11% de proteína e 14-20% de ácidos orgânicos e pectinas, entre outros. Essas qualidades tornam a algaroba uma espécie importante e de grande potencial na alimentação animal no semiárido brasileiro, principalmente, como fonte energética e proteica.

A utilização da algaroba em concentrados para ruminantes é limitada devido à presença de toxinas e fatores antinutricionais, como polifenólicos (taninos), compostos nitrogenados (alcaloides) e lectina (SATISH et al., 1999; BHATTA et al., 2007; ANDRADE-MONTEMAYOR et al., 2011).

De acordo com Sawal et al. (2004), as vagens de algaroba apresentam baixos níveis de tanino tóxico ao animal. No entanto, substâncias alcaloides foram isoladas como 3'-oxo-juliprosopina, secojuliprosopinal, uma mistura de 3-oxo- e 3'-oxo-juliprosina (NAKANO et al., 2004a), além da juliprosina e juliprosopina, que são inibidoras de crescimento de plantas (NAKANO et al., 2004b). Outro alcaloide isolado da *P. juliflora*, denominado julifloricina, exerce atividade antimicrobiana significativa, principalmente sobre bactérias Gram-positivas.

Este efeito foi comparado à ação da benzil penicilina, gentamicina e trimetropina (AQEEL et al., 1989; NAKANO et al., 2004b).

Em estudos realizados por Argôlo et al. (2010), alguns parâmetros de fermentação ruminal (pH, nitrogênio amoniacal e acetato:propionato) foram avaliados em cabras Saanen lactantes, não fistuladas, alimentadas com níveis de farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100% de substituição do milho na matéria natural do concentrado) e foi evidenciado 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 dos animais, apesar da eficiência de alimentação avaliada ter sofrido redução linear.

Objetivou-se avaliar, em cabras mestiças Anglo Nubianas fistuladas no rúmen, o efeito da substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba no concentrado sobre o consumo de nutrientes, assim como sobre o comportamento ingestivo, parâmetros ruminais (pH, concentração de nitrogênio amoniacal e AGV) e diversidade microbiana ruminal (bactérias e arqueas).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local, Animais e Delineamento Experimental

O experimento foi conduzido no setor de Caprinocultura do Departamento de Tecnologia Rural e Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Itapetinga-Bahia-Brasil, situada às coordenadas geográficas 15° 18' 14'' latitude sul e 40° 12' 20'' de longitude Wga.

Foram utilizadas quatro cabras adultas, mestiças, Anglo Nubianas, fistuladas, não lactantes e peso vivo médio de 31 kg, confinadas em baias individuais com dimensões de 1,5 × 1,0 m com piso ripado de madeira.

Os animais foram distribuídos em quadrado latino 4 x 4 para avaliar os efeitos de níveis de farelo de vagem de algaroba (FVA) em dietas isonitrogenadas, tendo como base volumosa a silagem de capim-elefante na proporção de 43% na matéria seca. A substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba no concentrado foi a variável independente utilizada para caracterizar os tratamentos, constituídos de quatro níveis de substituição (0; 33,3; 66,7 e 100% na matéria natural) (Tabela 1). As fontes de proteína utilizadas foram o farelo de soja e farelo de algodão.

Tabela 1 – Composição do concentrado em ingrediente nutricional (% MN).

Ingrediente	Nível de farelo de vagem de algaroba (% MN)			
	0	33,3	66,7	100
Milho moído	78,10	52,51	26,48	0,00
Farelo de algaroba	00,00	25,42	51,28	77,60
Farelo de soja	13,30	13,24	13,19	13,13
Farelo de algodão	4,92	4,96	5,00	5,05
Mistura mineral	3,68 ¹	3,85 ²	4,03 ³	4,20 ⁴
Total	100,00	100,00	100,00	100,00

¹Fosfato bicálcico 39,9%, Sal comum 20,1%, Sal mineral comercial 40,0%.

²Fosfato bicálcico 42,3%, Sal comum 19,2%, Sal mineral comercial 38,5%.

³Fosfato bicálcico 44,4%, Sal comum 18,6%, Sal mineral comercial 37,0%.

⁴Fosfato bicálcico 46,4%, Sal comum 17,9%, Sal mineral comercial 35,7%.

2.2 Consumo de Nutrientes

O experimento foi constituído de quatro períodos experimentais, cada um com 14 dias de duração: os nove primeiros dias de adaptação e os cinco dias restantes de coletas de dados. Com acesso à vontade ao alimento e à água, as cabras foram alimentadas às 8:00 e às 16:00 h. Foram feitas pesagens diárias da dieta fornecida e das sobras, de todos os animais, para estimar o consumo, sendo que as sobras foram mantidas em torno de 10% do total ofertado.

No período de coleta, do 10º ao 14º dia de cada período experimental, amostras dos volumosos, concentrados e das sobras de cada animal foram coletadas diariamente,

acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em *freezer*, para posteriores análises e determinação do consumo de nutrientes.

A composição química dos alimentos fornecidos (Tabela 2) e sobras foi determinada segundo métodos descritos por Detmann et al. (2012), e na determinação do teor de fibra em detergente neutro foi utilizada α -amilase termoestável antes da realização da extração com detergente neutro.

Os teores de carboidratos totais (CHOT) dos alimentos fornecidos e das sobras foram calculados segundo Sniffen et al. (1992): $CHOT = 100 - (\%PB + \%EE + \%CINZAS)$ e os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados subtraindo as concentrações dos carboidratos totais e de fibra em detergente neutro (FDN), de acordo com Hall et al. (1999): $CNF = CHOT - FDN$ (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição química do volumoso, dos concentrados e das dietas em percentual da matéria seca.

Item	SCE ¹	FVA ²	Concentrado			
			Nível de farelo de vagem de algaroba (% MN)			
			0	33,3	66,7	100
Matéria Seca	28,10	92,75	72,70	84,90	84,30	83,00
Matéria Orgânica	90,60	95,83	95,00	93,50	93,50	92,50
Proteína Bruta	4,09	7,82	13,54	13,47	13,45	13,30
Extrato Etéreo	3,87	1,64	4,00	3,50	2,80	2,30
Fibra em Detergente Neutro	78,90	29,65	34,00	31,40	33,20	34,60
Carboidratos não fibrosos	10,64	56,72	46,46	49,63	48,05	45,80
Carboidratos totais	89,54	86,37	80,46	81,03	81,25	80,40
Fibra em Detergente Ácido	48,85	24,15	13,30	14,10	14,80	19,10
Matéria Mineral	2,50	4,17	2,00	2,00	2,50	4,00
			Dieta			
Matéria Seca			53,52	60,48	60,13	59,39
Matéria Orgânica			93,11	92,25	92,25	91,68
Proteína Bruta			9,48	9,44	9,43	9,34
Extrato Etéreo			3,94	3,66	3,26	2,98
Fibra em Detergente Neutro			53,31	51,83	52,85	53,65
Carboidratos não fibrosos			31,06	32,86	31,96	30,68
Carboidratos totais			84,36	84,69	84,81	84,33
Fibra em Detergente Ácido			28,59	29,04	29,44	31,89
Matéria Mineral			2,22	2,22	2,50	3,36

¹SCE: Silagem de capim-elefante; ²FVA: Farelo de vagem de algaroba

2.3 Comportamento Ingestivo

Na avaliação do comportamento ingestivo dos animais, os mesmos foram submetidos a períodos de observação visual durante dois dias, ao final de cada período experimental, sendo a primeira observação no 12º dia de cada período experimental. Neste dia, os animais foram

observados durante 24 horas, em intervalos de 10 minutos, para a avaliação dos tempos de alimentação, ruminação e ócio. Durante a observação noturna, o ambiente foi mantido com iluminação artificial.

Na obtenção dos valores das variáveis comportamentais alimentação e ruminação (min/kg MS e FDN), eficiência alimentar (g MS e FDN/hora), eficiência em ruminação (g de MS e FDN/bolo e g MS e FDN/hora) e consumo médio de MS e FDN por período de alimentação, considerou-se o consumo voluntário de MS e FDN do 12º e 13º dia de cada período experimental, sendo as sobras computadas entre o 10º ao 14º dia.

O número de bolos ruminados diariamente foi obtido da seguinte forma: tempo total de ruminação (hora) dividido pelo tempo médio gasto na ruminação de um bolo. A concentração de MS e FDN em cada bolo (g) ruminado foram obtidas a partir da divisão quantidade de MS e FDN consumida (g/dia) em 24 horas pelo número de bolos ruminados diariamente. A eficiência de alimentação e ruminação foi obtida da seguinte forma:

$$EALMS = CMS/TAL;$$

$$EALFDN = CFDN/TAL;$$

Em que: EALMS (g MS consumida/h); EALFDN (g FDN consumida/hora) = eficiência de alimentação; CMS (g) = consumo diário de matéria seca; CFDN (g) = consumo diário de FDN; TAL (h/dia) = tempo gasto diariamente em alimentação.

$$ERUMS = CMS/TRU;$$

$$ERUFDN = CFDN/TRU;$$

Em que: ERUMS (g MS ruminada/h); ERUFDN (g FDN ruminada/h) = eficiência de ruminação e TRU (h/dia) = tempo de ruminação.

$$TMT = TAL + TRU;$$

Em que: TMT (h/dia) = tempo de mastigação total.

Os cálculos acima foram realizados conforme Carvalho et al. (2006).

O número de períodos de alimentação, ruminação e ócio foram contabilizados pelo número de sequências de atividades observadas na planilha de anotações. A duração média diária desses períodos de atividades foi calculada dividindo-se a duração total de cada atividade (alimentação, ruminação e ócio em h/dia) pelo seu respectivo número de períodos discretos.

2.4 Parâmetros Ruminais

No 14º dia de cada período experimental, foi feita a coleta do líquido ruminal via fístula, nos períodos de 0; 2; 4; 6 e 8 horas após a alimentação da manhã, sendo que o tempo 0 (zero) foi a coleta que antecedeu o fornecimento da ração. O fluido ruminal coletado do saco ventral do rúmen das cabras foi filtrado em quatro camadas de gaze, o pH foi mensurado imediatamente após a coleta do material com potenciômetro digital. Para determinação da

concentração de amônia (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen, as amostras foram fracionadas e acidificadas com ácido sulfúrico 20% e ácido fosfórico 25% (1 mL de ácido:10 mL fluido), respectivamente, imediatamente após a coleta. Parte das amostras coletadas, 4 horas após a alimentação da manhã, foi congelada imediatamente após a coleta em *freezer* à 20°C negativos para posteriores análises de diversidade microbiana.

Ao final do experimento, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 2 000 x g, durante 10 minutos, e retirada 2 mL do sobrenadante para determinar a concentração de N-NH₃, obtida após destilação com 5 mL de KOH 2N, conforme técnica modificada de Vieira (1980) (Anexo E).

As amostras destinadas à determinação de AGV foram processadas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Ilhéus-Bahia-Brasil. As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 800 x g por 15 minutos. A determinação e a quantificação de ácidos graxos voláteis foram realizadas por cromatografia gasosa (GC), segundo método preconizado por Erwin et al. (1961). Para tal, foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo GC-2010 da Shimadzu Corporation, equipado com coluna Rtx-Wax 30m x 0,25mm x 0,25mm. As temperaturas utilizadas para operação do injetor, coluna de separação e detector de ionização de chamas foram de 210, 90 a 170 e 230°C, respectivamente. Foram preparadas soluções na concentração de 20 mM dos ácidos acético, propiônico e butírico, de forma a produzir uma solução padrão de AGV de concentração conhecida. Para cada determinação, foram injetados 1,0 µL de amostra, sendo o resultado obtido através de um integrador que utilizou a solução padrão como base para o cálculo das concentrações de AGV da amostra.

2.5 Extração de DNA, Amplificação por PCR e Análise de DGGE

Nos Laboratórios de Monitoramento Ambiental e Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) Ilhéus-Bahia-Brasil, o DNA microbiano total foi extraído do conteúdo ruminal coletado 4 horas após a alimentação matinal, no 14º dia de cada período experimental, sendo as amostras submetidas a um processo de lavagem com PBS 1x (Solução Salina Tamponada) e centrifugações a 7 000 x g por 15 minutos. Foi adicionado ao pélete, 600 µL de TESC (10 M Tris-base, 1 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8,3), juntamente com 30 µL de Tween 80 (Merck) e homogeneizado. A amostra foi submetida ao banho ultrassônico Magiclean 1600 (Unique®), por 2 minutos, para que houvesse desfloculação das partículas bacterianas que, possivelmente, poderiam estar aderidas à matéria orgânica.

Após o banho ultrassônico, as amostras foram novamente centrifugadas por 3 minutos a 50 x g e, coletou-se o sobrenadante que, por sua vez, foi centrifugado a 7 000 x g por 5 minutos. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o péletefoi ressuspense em 700 µL de Tampão de Lise (50mM:50mM:500mM), 12 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹) (Promega) e 12 µL de SDS

10% (Dodecil Sulfato de Sódio), em seguida, foram adicionados às amostras e homogeneizados pela inversão dos tubos. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 65°C, por 30 minutos, homogeneizando a cada 10 minutos.

A lise física das células bacterianas foi realizada por meio de choque térmico, em três ciclos, 10 minutos em ultra *freezer* (80°C negativos) e 5 minutos em banho-maria a uma temperatura de 80°C. Um volume equivalente de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, e a mistura foi gentilmente homogeneizada. A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 1 800 x g e a fase aquosa foi recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,7 volume de isopropanol gelado (J.T. Barker) e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. A solução foi misturada suavemente (5-10 vezes) e mantida a 20°C negativos por 16 h. Foi obtido o pélete das amostras por centrifugação, durante 5 minutos a 10 000 x g, e depois o pélete foi lavado com etanol 70% gelado e ressuspenso em 50-100 µL de TE clássico (10 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, pH 8,0).

Quando necessário, o DNA extraído foi purificado em mini-colunas, empacotadas com matriz de gel Sephadex G-200, equilibradas com TE clássico, segundo Tsai e Olson, (1992). Um volume de 250 µL do eluente foi adicionado às colunas, juntamente com o DNA de cada amostra e, posteriormente, incubadas em banho-maria (50-60°C) por 10 minutos, sendo em seguida centrifugadas por 2 minutos a 1 800 x g.

As análises da diversidade microbiana foram efetuadas através de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). Na amplificação dos fragmentos do DNA, foi utilizado o par de iniciadores para o Domínio *Bacteria*: 357F (5' - CAC GGG GTA CGG GAG GCA GCA G - 3') e 518R (5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Integrated DNA Technologies, Inc.), com o grampo de GC na terminação 5' do iniciador *forward* (5' - CGC CCG CCG CGC CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG - 3') (MUYZER et al., 1993). A região variável V3 de 16S rDNA foi utilizada por ser uma região conservada de bactérias comumente encontradas no trato gastrointestinal e amplificam aproximadamente 200 bp do gene bacteriano. Para o Domínio *Archaea*, foi utilizado o par de iniciadores 1100F (5' - AAC CGT CGA CAG TCA GGY AAC GAG CGA G - 3'), junto com o grampo de GC e 1400 R (5' - CGG CGA ATT CGT CGT AGG AGC AGG GAC -3'), descritos por Kudo et al. (1997). A utilização do grampo de GC acoplado a um dos iniciadores impede a completa separação das fitas do DNA, aumentando a sensibilidade da Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) (SHEFFIELD et al., 1989).

A mistura para reação da PCR (25 µL) para o Domínio *Bacteria* consistiu de: 17,65 µL de Água Milli-Q estéril, 1 x do Tampão da *Taq* polimerase, 2,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada iniciador (357F com grampo de GC e 518R), 200 µM de cada um dos dNTP e 0,5 U da Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (*c.* 20 ng) em um volume final de 25 µL. A amplificação foi obtida seguindo o programa: desnaturação a 95°C, por 5 minutos,

seguida de 30 ciclos de 95°C por 60s, 55°C por 60s, 72°C por 60s, e a PCR foi finalizada pela extensão a 72°C por 30 minutos. Para o Domínio *Archaea*, foi realizada a PCR usando uma mistura de 16,85 µL de Água Milli-Q estéril, 1 x do Tampão da *Taq* polimerase, 2,1 mM de MgCl₂, 280 µM de cada iniciador (1100F com grampo de GC e 1400R), 280 µM de cada um dos dNTP e 2,5 U da Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e 2 µL de DNA (*c.* 20ng) em um volume final de 25 µL. A amplificação foi obtida seguindo o programa: desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 90s, e extensão final a 72°C por 3 minutos. As reações foram analisadas em gel de agarose a 2% (m/v), corado com brometo de etídio, com transiluminador de luz ultravioleta (KODAK).

A DGGE foi realizada utilizando o Sistema para Análise de Mutações CDC 20 x 20 cm (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), sendo 20 µL dos produtos de PCR colocados em gel de poliacrilamida a 8% em 0,5 mmol L⁻¹ com gradiente desnaturante de 30% a 55% em tampão 1x Tris-Acetato-EDTA e 35% a 65% em tampão 0,5x Tris-Acetato-EDTA para análise da diversidade bacteriana e de arqueas, respectivamente, ambas em uma corrida a voltagem de 85 V, por 20 minutos, e em seguida de 200 V, por 5h, a 60°C. As bandas de DNA foram visualizadas por coloração com prata.

2.6 Análises Estatísticas

A regressão da produção para os parâmetros fermentativos, consumo e comportamento ingestivo utilizou-se o Proc MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). O modelo estatístico de regressão linear múltipla com duas variáveis independentes (ou seja, os níveis de substituição e tempo de coleta de dados) repetições por tratamento foi:

$$Y_{ijk} = \beta_0 + \beta_1 Tr + \beta_2 Tr^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 Tr \times T + \epsilon_{ijk}$$

Em que: Y_{ijk} é o valor observado de Y resposta variável nos níveis Tr e T, na repetição k; β_n é o coeficiente de regressão associado com o fator de interesse ($X_{1i}, X_{1i}^2, X_{2j}, X_{2j}^2, X_{1i}X_{2j}$); X_{1i} é o valor do nível X_{1i} do X_1 variável independente; X_{2j} é o valor do nível de X_{2j} do X_2 variável independente; ϵ_{ijk} é o efeito do resíduo da regressão associado com cada Y_{ijk} valor observado, sendo $\epsilon \sim NID(0, \sigma_\epsilon^2)$. Em um delineamento inteiramente casualizado, $\epsilon_{ijk} = \epsilon_{ijk} + f_{aj}$, em que $f_{aj} = \mu_{Y_{ij}} - \hat{Y}_{ij}$, em que f_{aj} é a falta de ajuste do modelo para o Y_{ij} ponto.

A análise dos dados foi pelo procedimento MIXED do SAS (LITTELL et al., 1996). Os efeitos dos tratamentos e os tempos foram decompostos em contrastes polinomiais lineares a 4º grau. Além disso, a interação dos tratamentos ao longo do tempo foi examinada, usando a opção de fatia de MIXED e contrastes. A configuração mais baixa da informação Akaike critério (AIC) foi obtida utilizando o componente de variância (VC):

$$Y_{ijk} = \mu + Tr_i + T_j + Tr_i T_j + \epsilon_{ijk}; NID(0; \sigma^2)$$

Em que: Tr = níveis de substituição(0;33,3; 66,7 e 100%) e T = tempo (0; 2; 4; 6 e 8 h).

Para escolher a melhor equação, os fatores Tr e T e as interações não significativas em $P < 0,05$ foram retiradas do modelo. Os contrastes da interação foram utilizados para comparar o efeito dos níveis de extratos e interações ao longo do tempo em pH, N-NH₃, AGV.

As técnicas estatísticas multivariadas foram realizadas para avaliar a estrutura multivariada contida nos dados originais. A partir dos perfis de bandas dos géis de DGGE, foram elaboradas matrizes binárias de presença e ausência de bandas para cada uma das repetições, em cada coleta, em função da posição que as bandas ocupavam no gel, para identificar a presença ou não de bandas, codificadas por 1 e 0, respectivamente (KOZDRÓJ e ELSAS, 2001). A partir dessa matriz de dados, foi feita a análise de agrupamento por dendograma para a qual foi utilizado o cálculo da similaridade entre os indivíduos e o método de agrupamento UPGMA (método das médias das distâncias) com o índice de semelhança Raup-Crick (RAUP e CRICK, 1979), por meio do programa estatístico Past.

A análise Biplot, aplicada aos Componentes Principais (CP), foi utilizada para verificar a correlação entre as variáveis analisadas e identificar quais variáveis sofreram maior influência das dietas. Para esta análise, foi utilizado o programa Past. Para a confecção do gráfico de riqueza de espécies e os diagramas de Venn, foram utilizadas a Microsoft Excel 2010 e a Microsoft Power Point 2010, utilizando o padrão de bandas geradas no perfil do DGGE, considerando apenas os níveis de substituição do milho pelo farelo da vagem de algaroba.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise dos contrastes linear (L), quadrático (Q) e cúbico(C) não se observou efeito ($P>0,05$) dos níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (FVA) sobre o consumo de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e carboidratos totais (CHOT) (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias para os consumos de nutrientes em função dos níveis de farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho no concentrado para cabras.

Item	Níveis de Farelo de Vagem de Algaroba (% MN)				EPM	Efeito [†]		
	0	33,3	66,7	100		L	Q	C
	Consumo (kg/dia)							
Matéria Seca	0,713	0,728	0,742	0,753	0,060	0,77	0,98	0,99
Matéria Orgânica	0,667	0,673	0,685	0,690	0,056	0,84	0,99	0,97
Proteína Bruta	0,072	0,074	0,077	0,077	0,005	0,62	0,87	0,95
Extrato Etéreo	0,028	0,028	0,027	0,026	0,002	0,73 ¹	0,90	0,95
Matéria Mineral	0,028	0,026	0,023	0,021	0,002	0,23	0,97	0,85
FDN	0,356	0,349	0,355	0,395	0,031	0,61	0,66	0,93
FDA	0,201	0,194	0,196	0,230	0,017	0,48	0,46	0,84
CNF	0,365	0,315	0,326	0,350	0,012	0,57	0,03 ²	0,43
FDNMS (%)	49,82	47,80	46,72	52,37	0,830	0,30	0,02 ³	0,36

FDN – fibra em detergente neutro; FDA – fibra em detergente ácido; CNF – carboidratos não fibrosos; FDNMS - consumo de FDN como percentual da ingestão de matéria seca.

[†]L, Q e C – efeito linear, quadrático e cúbico.

¹ $\hat{Y} = (0,032 \pm 0,0028)^* - (0,00013 \pm 0,000045)Tr^{***}$

² $\hat{Y} = (0,3761 \pm 0,0072)^* - (2,81^{-6} \pm 1,31^{-6})Tr^{2***}$

³ $\hat{Y} = (48,38 \pm 0,6)^{**} - (0,054 \pm 0,029)Tr^{ns} + (0,0010 \pm 0,00028)Tr^{2***}$

^{ns} não significativo; *significativo ($P<0,0001$); **significativo ($P<0,001$); ***significativo ($P<0,05$).

O consumo da matéria seca não foi influenciado pelas dietas, este resultado era esperado pelo fato de na Tabela 2 observar-se a semelhança entre os teores dos nutrientes. Oliveira (2009) também observou essa semelhança, quando avaliou os mesmos níveis de farelo de algaroba no concentrado, fornecidos para cabras da raça Saanen em lactação. A explicação para os resultados relatados deve-se ao fato que a substituição de alimentos tradicionais por fontes alternativas de energia sem elevar os teores de FDN em níveis que restrinjam o consumo e as dietas sendo isonitrogenadas não afeta o consumo de matéria seca dos animais.

O consumo de PB não foi afetado ($P>0,05$), quando se substituiu o milho pelo FVA nos diferentes níveis, pelo fato das dietas serem isonitrogenadas. Portanto, como não houve variação no consumo de MS, não observou-se efeito sobre essa variável.

O consumo de CNF apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$) com os níveis de FVA, em razão de as concentrações de CNF terem sido alteradas pela variação da proporção dietética do milho, estimando-se máximo consumo relativo de 0,382 kg/dia no nível de 35,4% de substituição do milho pelo FVA. De acordo com o Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS, 2002), os açúcares e ácidos orgânicos pertencem à fração A, de rápida degradação ruminal. No farelo de vagem de algaroba, o amido (11-17%) não é o principal componente energético, mas sim os mono e oligossacarídeos (28%), somados aos ácidos orgânicos e à pectina (20%). Todavia, o amido representa 91,45% dos carboidratos não estruturais do milho e pertence à fração B1, de degradação intermediária, da mesma forma que a pectina. Figueiredo et al. (2007) relataram valor da fração A + B1 (59,92%) do farelo de vagem de algaroba inferior ao do milho (72,20%). O resultado encontrado neste trabalho diverge de Oliveira (2009), cujos teores e consumo de CNF reduziram linearmente em função dos níveis de FVA.

Animais recebendo dietas com maiores níveis de FVA apresentaram menor consumo de extrato etéreo (EE), este comportamento deve-se a menor concentração deste nutriente no FVA. Outros autores também observaram o mesmo comportamento, Oliveira (2009), Argôlo et al. (2010) e Pereira (2012).

Houve efeito significativo das dietas ($P < 0,0001$) com ajuste quadrático da adição de FVA sobre o consumo de FDN como percentual da ingestão de matéria seca (FDNMS), estimando-se mínimo consumo relativo de 47,7% no nível de 26,8% de substituição do milho pelo FVA. Possivelmente, isso se deve ao fato do farelo de algaroba possuir maior concentração de FDN, quando comparado com o milho. Para cabras, o teor máximo de FDN nas dietas que não exerce efeito inibidor do consumo não está bem definido, mas no nível de consumo de fibra das cabras deste trabalho, o mecanismo de controle do consumo parece não ter sido ocasionado pelo fator físico de enchimento ruminal.

A análise de Componentes Principais (PCA) permitiu redimensionar o espaço das informações originais em um novo espaço formado por duas variáveis latentes denominadas de Componentes Principais (CP1 e CP2), criadas por combinações lineares das variáveis originais na região que deteve a maior concentração da variância original. Essas duas novas variáveis, colocadas ortogonalmente, geraram uma distribuição bidimensional das variáveis, conforme se observa na Figura 1.

A análise biplot, aplicada aos componentes principais, explicou 97,29% (CP 1 = 72,61% e CP 2 = 24,68%) da variabilidade total observada nos dados de consumo de nutrientes (Figura 1). Na Tabela 4 estão apresentadas as correlações entre cada variável e seus respectivos componentes principais, indicando aquelas variáveis que mais discriminaram em cada eixo. A CP 1 (eixo horizontal ou eixo X) explicou 72,61% da variação total, mostrando uma clara

discriminação dos níveis de 66,7 e 100% de substituição do milho pelo FVA em relação aos demais: 0 e 33,3%.

As variáveis com correlações positivas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras à direita em CP1 e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras à esquerda em CP1 (Figura 1) (Tabela 4). Assim, as variáveis CCT, CMO, CMS, CFDN, CFDA, CPB e CFDNMS, nessa ordem, foram responsáveis pela discriminação dos níveis de substituição de 66,7 e 100%, enquanto que a variável CEE foi a responsável pela discriminação dos níveis 0 e 33,3% de substituição do milho pelo FVA.

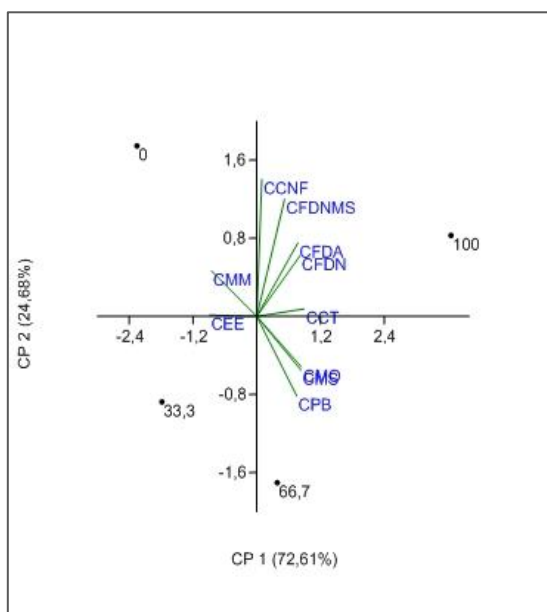


Figura 1 – Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e das variáveis de consumo de nutrientes, CMS – consumo de matéria seca; CMO – consumo de matéria orgânica; CPB – consumo de proteína bruta; CEE – consumo de extrato etéreo; CMM – consumo de matéria mineral; CFDN – consumo de fibra em detergente neutro; CFDA – consumo de fibra em detergente ácido; CCT – consumo de carboidratos totais; CCNF – consumo de carboidratos não fibrosos; CFDNMS - consumo de FDN como percentual da ingestão de matéria seca.

Tabela 4 – Correlação entre variáveis de consumo de nutrientes e cada componente principal (CP).

	CMS	CMO	CPB	CEE	CMM	CFDN	CFDA	CCT	CCNF	CFDNMS
CP 1	0,93	0,94	0,84	-0,99	-0,95	0,91	0,86	1,00	0,11	0,58
CP 2	-0,36	-0,34	-0,53	0,01	0,30	0,40	0,49	0,05	0,91	0,78

CMS – consumo de matéria seca; CMO – consumo de matéria orgânica; CPB – consumo de proteína bruta; CEE – consumo de extrato etéreo; CMM – consumo de matéria mineral; CFDN – consumo de fibra em detergente neutro; CFDA – consumo de fibra em detergente ácido; CCT – consumo de carboidratos totais; CCNF – consumo de carboidratos não fibrosos; CFDNMS - consumo de FDN como percentual da ingestão de matéria seca.

Quanto ao CP 2 (eixo vertical ou eixo Y), as variáveis com correlações positivas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras acima do zero em CP2 e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação de objetos ou amostras abaixo do zero em CP2. Assim, a variável CPB foi a responsável pela discriminação do nível de substituição de 66,7% , enquanto que as variáveis CCNF e CFDNMS foram discriminantes do nível de 100% de substituição do milho pelo FVA, nessa ordem.

Não foi observado efeito significativo ($P>0,05$) para os tempos gastos com alimentação em função dos níveis de FVA nas dietas experimentais, apresentando valor médio de 4,29 h/dia (Tabela 5). Esse resultado foi consistentemente semelhante aos encontrados por Oliveira (2009), para cabras da raça Saanen, alimentadas com níveis de FVA de 4,21 h/dia, e por Church (1988), de 4,23 h/dia.

O tempo de ruminação aumentou linearmente ($P<0,01$) (Tabela 5) com os níveis de adição do FVA, devido ao aumento do consumo de FDN como percentual da ingestão de matéria seca (FDNMS) da dieta composta por níveis de substituição do milho pelo farelo de algaroba acima de 26,8%, isso se deve à qualidade da fibra e não à quantidade da mesma na dieta, provavelmente deve-se a uma maior ingestão de FDN do volumoso. Usualmente, alterações nos tempos gastos nas atividades de alimentação e ruminação estão sendo observadas em trabalhos nos quais as dietas experimentais apresentaram variações nos teores de fibra (CARVALHO et al., 2006; PEREIRA et al., no prelo).

Estes resultados divergem daqueles encontrados por Oliveira (2009), que não observou diferença significativa para o tempo gasto na ruminação, que foi em média 8,76 h/dia, em cabras Saanen lactantes alimentadas com níveis de substituição (0,0; 33,3; 66,7 e 100 % da matéria natural) do milho pelo farelo de algaroba; e diverge dos resultados encontrados por Pereira et al. (no prelo), cuja média para o tempo gasto na ruminação foi de 10,08 h/dia para ovinos Santa Inês alimentados com níveis de substituição de capim-elefante pelo FVA (0; 15; 30 e 45% na MS), que também não observaram alteração nos tempos disponíveis para alimentação, mas, ao verificarem menor consumo de MS da dieta constituída somente de silagem, concluíram que houve regulação física de enchimento pelo fato de o tempo de mastigação não ter sido alterado em função das dietas. Vale ressaltar que essas diferenças indicam que o farelo de algaroba foi capaz de causar alteração nos tempos gastos com ruminação em cabras não lactantes que apresentaram menor ingestão de MS e de FDN.

Carvalho et al. (2004) descreveram que a ruminação é um recurso fisiológico ativado com a diminuição no tempo de alimentação para o melhor aproveitamento do alimento, podendo, assim, reduzir o efeito de enchimento da dieta. Este fato se aplica neste estudo, uma vez que os tempos disponíveis para ruminação aumentaram. Não houve a regulação física por distensão do retículo-rúmen pelo fato de que o consumo de FDN não variou, uma vez que o tempo requerido para mastigação se alterou em função das dietas, em que houve aumento linear

no número de mastigações meréricas e totais com a adição de farelo de algaroba (Tabela 5). Já para o número de mastigações meréricas por bolo (NMMnb; nº/bolo) e o tempo de mastigações por bolo (seg/ bolo) apresentaram efeito linear negativo (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias de quadrados mínimos, erro padrão da média (EPM) e indicativos de significância para os efeitos dos contrastes sobre o comportamento ingestivo em cabras alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.

Item	Níveis de Farelo de Vagem de Algaroba (% MN)				EPM	Efeito [†]		
	0	33,3	66,7	100		L	Q	C
CMS (kg/ dia)	0,71	0,73	0,74	0,75	0,06	0,77	0,98	0,99
CFDN (kg/ dia)	0,36	0,35	0,35	0,39	0,03	0,61	0,66	0,93
CFDNMS (%)	49,81	47,79	46,73	52,38	0,83	0,30	0,02 ¹	0,37
Alimentação (h/ dia)	4,00	3,87	4,15	5,15	0,26	0,11	0,25	0,88
Ruminação (h/ dia)	4,17	5,17	6,57	7,57	0,48	0,003 ²	1,00	0,74
Mastigação								
NMMnb (nº/ bolo)	63,35	61,85	67,05	50,80	2,52	0,10 ³	0,09	0,14
TRB (seg/ bolo)	49,75	50,00	50,60	48,35	1,45	0,78 ⁴	0,66	0,80
NMMnd (nº/ dia)	19318	23123	31113	30074	2224	0,02 ⁵	0,41	0,32
TMT (h/ dia)	8,17	9,05	10,72	12,72	0,68	0,008 ⁶	0,54	0,91
Ócio (h/ dia)	15,82	14,95	13,27	11,27	0,68	0,008 ⁷	0,54	0,91

CMS – consumo de matéria seca; CFDN – consumo de FDN; CFDNMS – proporção de FDN consumida com base na MS; NMMnb – número de mastigações meréricas por bolo; TRB – tempo de ruminação por bolo; NMMnd – número de mastigações meréricas por dia; TMT – tempo de mastigação. [†]L, Q e C – efeito linear, quadrático e cúbico.

$$^1 \hat{Y} = (48,34 \pm 0,61)^* - (0,054 \pm 0,029)Tr^{ns} + (0,0010 \pm 0,0003)Tr^{2***}$$

$$^2 \hat{Y} = (3,1685 \pm 0,2494)^* + (0,02958 \pm 0,00399)Tr^*$$

$$^3 \hat{Y} = (67,5444 \pm 1,5525)^* - (0,1191 \pm 0,02489)Tr^{**}$$

$$^4 \hat{Y} = (51,0065 \pm 1,1680)^* - (0,0517 \pm 0,01873)Tr^{****}$$

$$^5 \hat{Y} = (18499 \pm 3040,54)^* + (157,65 \pm 48,7537)Tr^{***}$$

$$^6 \hat{Y} = (7,4655 \pm 0,8487)^* + (0,04665 \pm 0,01361)Tr^{***}$$

$$^7 \hat{Y} = (16,5345 \pm 0,8487)^* - (0,04665 \pm 0,01361)Tr^{***}$$

^{ns} não significativo; *significativo (P<0,0001); **significativo (P<0,001); ***significativo (P<0,01); ****significativo (P<0,05).

Para o tempo despendido em ócio (Tabela5), observou-se efeito linear negativo, de acordo com os níveis de substituição pelo FVA nas dietas experimentais. Certamente, isso foi observado porque os tempos de ruminação apresentaram respostas inversas. Diante do exposto, a composição desta fibra pode ter influenciado significativamente as atividades comportamentais, principalmente a ruminação.

A eficiência de alimentação, expressa em gMS/h, apresentou efeito linear na análise dos contrastes (P<0,05) pelos níveis de FVA em substituição ao milho na dieta de cabras mestiças Anglo Nubiana (Tabela 6), contudo, não foi possível obter uma equação que se ajustasse aos dados. Por outro lado, a eficiência de alimentação, expressa em gFDN/h, apresentou um comportamento quadrático com ponto de máximo estimado no nível de 71,5% de substituição,

em função do consumo de FDN como percentual da ingestão de matéria seca (FDNMS) (Tabela 4), que apresentou o mesmo comportamento.

A eficiência de alimentação e ruminação exibe relação direta com os níveis de ingestão de nutrientes dos animais. Assim, a ausência de efeito significativo para os consumos de MS pode ter contribuído para a falta de relação observada entre a eficiência de alimentação de MS e os níveis de FVA em substituição ao milho.

Tabela 6 – Médias de quadrados mínimos, erro padrão da média e indicativos de significância para os efeitos dos contrastes das eficiências de alimentação e ruminação em cabras alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.

Item	Níveis de FVA (% MN)				EPM	Efeito [†]		
	0	33,3	66,7	100		L	Q	C
<i>Eficiência de Alimentação</i>								
EALMS (gMS/h)	185,50	200,40	173,42	149,95	14,87	0,019 ¹	0,089	0,324
EALFDN (gFDN/h)	92,12	95,52	82,62	78,32	7,21	0,099	0,559 ²	0,406
<i>Eficiência de Ruminação</i>								
Bolos (nº/dia)	309,07	372,63	474,83	579,57	39,67	0,002 ³	0,627	0,847
ERUMS (gMS/h)	171,90	145,30	110,15	100,57	11,50	0,002 ⁴	0,462	0,507
ERUFDN (gFDN/h)	85,60	69,00	52,57	52,62	5,56	0,004 ⁵	0,201	0,552

EALMS – eficiência de alimentação da MS; EALFDN - eficiência de alimentação da FDN; ERUMS – eficiência de ruminação da MS; ERUFDN – eficiência de ruminação da FDN. [†]L, Q e C – efeito linear, quadrático e cúbico.

¹ Regressão não significativa.

² $\hat{Y} = (81,6764 \pm 0,3128)^* + (0,5916 \pm 0,01508)Tr^* - (0,00414 \pm 0,000145)Tr^{2*}$.

³ $\hat{Y} = (319,65 \pm 49,9409)^* + (2,2937 \pm 0,8008)Tr^{****}$.

⁴ $\hat{Y} = (185,15 \pm 6,0256)^* - (0,8805 \pm 0,09662)Tr^*$.

⁵ $\hat{Y} = (89,2124 \pm 3,6603)^* - (0,3852 \pm 0,05869)Tr^*$.

significativo (P<0,001); *significativo (P<0,001); *significativo (P<0,01); ****significativo (P<0,05).

Neste estudo, os valores observados para a eficiência de ruminação, ao considerar o número de bolos formados, apresentaram efeito linear crescente (Tabela 6), sugerindo que o farelo de algaroba favoreceu a frequência de regurgitação ao mesmo tempo em que reduziu a quantidade em gramas de MS e de FDN ruminados a cada hora. Atribuem-se as eficiências de ruminação, verificadas neste estudo, ao teor e qualidade físico-química de fibras, provenientes da silagem de capim-elefante, associados aos de farelo de algaroba, além disso, o comportamento inverso do número de bolos ruminados (nº/dia) em relação à eficiência de ruminação de MS e FDN, possivelmente se devem à questão do aumento do teor de fibra digestível com menor tamanho de partícula, proporcionado pela adição de farelo de algaroba. Pereira et al. (no prelo) concluíram que o volumoso com baixa qualidade de fibra, como é o caso do capim-elefante com maior proporção de FDA (70,9%) e de lignina (12,1%), quando associado ao farelo de vagem de algaroba em dietas de ovinos, melhorou as eficiências de alimentação e ruminação e não alterou os tempos gastos com alimentação, ruminação e ócio.

Os resultados encontrados para as variáveis de comportamento ingestivo de cabras mestiças Anglo Nubianas, alimentadas com FVA em substituição ao milho, corrobora com a análise biplot aplicada aos CP, que explicou 96,78% da variabilidade total observada nos dados (Figura 2). A CP 1 explicou 80,78% da variação total, mostrando uma discriminação dos níveis de substituição de 0 e 33,3% dos demais níveis: 66,7 e 100%. Este componente apresenta um contraste entre as variáveis do Grupo 1 (OC, ERUMS, EALFDN, EALIMS, ERUFDN, NMMnb e TRB) vs Grupo 2 (B, TMT, RU, AL e NMMnd), ou seja, valores elevados das variáveis do Grupo 1 e baixos valores das variáveis do Grupo 2 deslocaram os níveis 0 e 33,3% de substituição do milho pelo FVA para a parte positiva do gráfico em CP 1, enquanto valores elevados para o Grupo 2 e baixos para o Grupo 1 deslocaram os níveis de substituição 66,7 e 100% para a parte negativa do gráfico em CP 1 (Figura 2) (Tabela 7).

Em relação ao CP 2, as variáveis com correlações positivas, TRB, NMMnb e NMMnd, na ordem, foram responsáveis pela discriminação do nível de substituição de 66,7% na parte superior do gráfico em CP 2, enquanto que a variável ERUFDN foi responsável pela discriminação dos níveis 0 e 100% de substituição do milho pelo FVA, possivelmente em virtude dos valores de FDN na dieta serem similares.

Houve efeito significativo linear crescente ($P < 0,05$) nos valores de pH em função dos níveis de FVA no concentrado e efeito cúbico com relação ao tempo de coleta até 8 horas após a alimentação, como mostra a Figura 3. Os valores médios de pH foram de: 6,52; 6,60; 6,61 e 6,70 para os tratamentos de 0; 33,3; 66,7; e 100%, respectivamente, de FVA em substituição ao milho. Os resultados médios de pH obtidos no fluido ruminal das cabras deste experimento, na sua totalidade, estão na faixa considerada normal entre 5,5 e 7,0.

Para cabras da raça Saanen em lactação, recebendo dieta similar, Argôlo et al. (2010) não observaram efeito significativo do tempo de coleta e níveis de substituição do FVA sobre o pH ruminal, tendo encontrado média igual a 6,95. Gonçalves et al. (2001), trabalhando com cabras da raça Alpina, não gestantes e não lactantes, recebendo dietas compostas por diferentes relações volumoso: concentrado, observaram pH de 6,5 a 6,9 nos animais que receberam 40 e 20% de concentrado, respectivamente. Foi observado por esses autores que houve um decréscimo quadrático ($P > 0,05$) do nível de concentrado sobre o pH e que o mesmo atingiu seu ponto mínimo entre 2 a 4 horas após cada alimentação. Segundo Van Soest (1994), isso acontece devido à maior taxa de produção de ácidos graxos voláteis, provenientes da fermentação da fração não fibrosa do alimento. No entanto, neste estudo, o pH ruminal apresentou valores mínimos estimados para os tratamentos de 0; 33,3; 66,7; e 100% de FVA em substituição ao milhode 6,33; 6,34; 6,46 e 6,52, respectivamente, com 2,1 horas e valores máximos de 6,68; 6,74; 6,80 e 6,86 entre 6,5 e 7 horas após a alimentação. O elevado valor de pH, observado para o tratamento de 100%, quase 7 horas após a ingestão, deve-se ao tempo de ruminação, que aumentou linearmente entre as dietas, quando há ruminação, conseqüentemente,

existe um aumento tanto da área superficial quanto da taxa de fermentação do alimento. A ruminação também eleva o fluxo de saliva, que mantém o pH favorável para os microrganismos e animais (RUSSELL e RYCHLIK, 2001).

A concentração de N-NH₃ apresentou comportamento de quarto grau ($P < 0,05$) em função dos horários de coleta. Não houve influência das dietas sobre a concentração de N-NH₃, cujas médias foram de: 7,95; 7,68; 8,88 e 8,36 mmol/L para os tratamentos de 0; 33,3; 66,7; e 100% de FVA em substituição ao milho. Foi observado um pico de produção de nitrogênio amoniacal 2 horas após a alimentação (Figura 4). Os valores de N-NH₃, para todos os níveis de farelo de vagem de algaroba, foram superiores a 5 mmol/L de líquido ruminal, nível mínimo necessário para manter as funções normais do rúmen como sugerido por Satter e Slyter (1974). No entanto, o nível de amônia deve ser superior a 10 mmol/L, para que haja aumento da digestão ruminal da matéria seca, e superiores a 20 mmol/L, para que ocorra aumento da ingestão de matéria seca (LENG, 1990). Normalmente, a concentração de amônia ruminal varia com o tempo decorrido da alimentação, o local de amostragem no rúmen, o balanço entre proteína e energia na dieta, solubilidade e o nível de proteína da ração (EARDMAN et al., 1986).

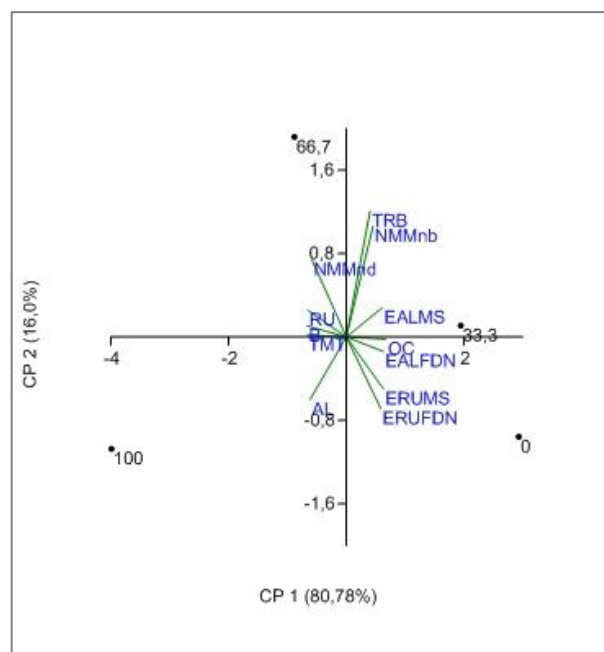


Figura 2 – Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e das variáveis de comportamento ingestivo. AL – alimentação; RU – ruminação; OC – ócio; NMMnb – número de mastigações meréricas por bolo; TRB – tempo de ruminação por bolo; NMMnd – número de mastigações meréricas por dia; TMT – tempo de mastigação; EALMS – eficiência de alimentação da MS; EALFDN - eficiência de alimentação da FDN; B – número de bolos; ERUMS – eficiência de ruminação da MS; ERUFDN – eficiência de ruminação da FDN.

Tabela 7 – Correlação entre variáveis de comportamento ingestivo e cada componente principal (CP).

	AL	RU	OC	NMMnb	TRB	NMMnd	TMT	EALMS	EALFDN	B	ERUMS	ERUFDN
CP 1	-0,91	-0,98	1,00	0,67	0,60	-0,87	-1,00	0,91	0,93	-1,00	0,94	0,87
CP 2	-0,40	0,17	-0,01	0,70	0,80	0,49	0,01	0,19	-0,10	0,07	-0,33	-0,45

AL – alimentação; RU – ruminação; OC – ócio; NMMnb – número de mastigações meréricas por bolo; TRB – tempo de ruminação por bolo; NMMnd – número de mastigações meréricas por dia; TMT – tempo de mastigação; EALMS – eficiência de alimentação da MS; EALFDN - eficiência de alimentação da FDN; B – número de bolos; ERUMS – eficiência de ruminação da MS; ERUFDN – eficiência de ruminação da FDN.

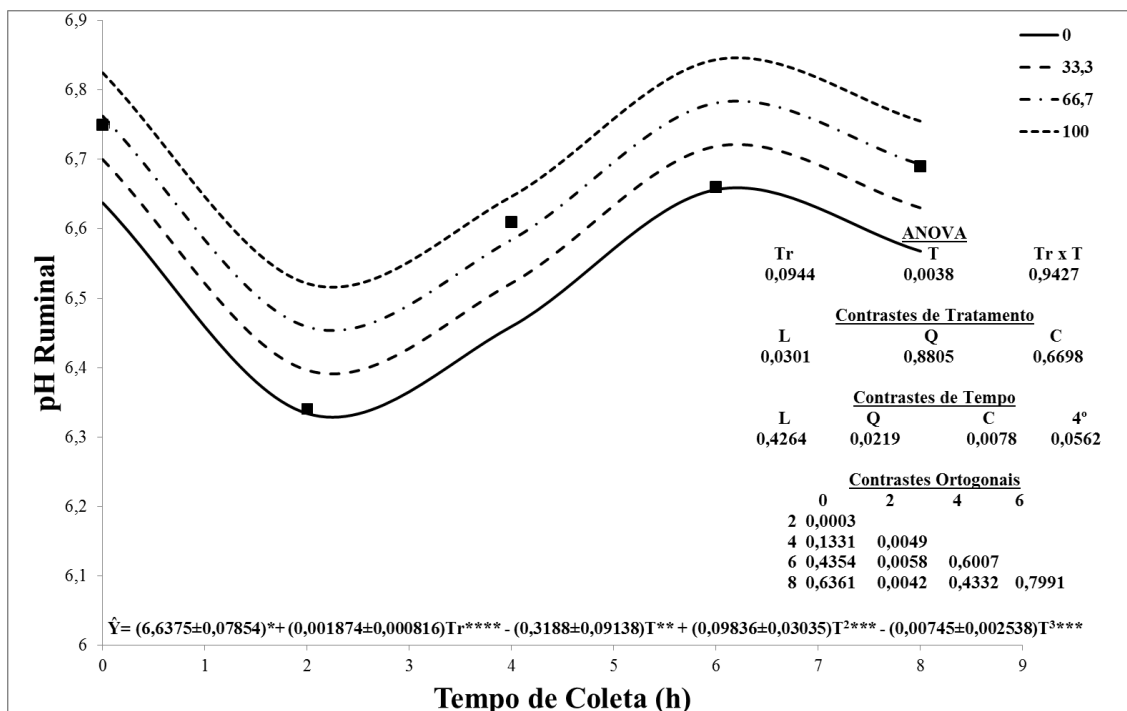


Figura 3 – pH ruminal em cabras fistuladas, não lactantes, alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.

*significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; *** significativo ao nível de 0,01 de probabilidade; ****significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

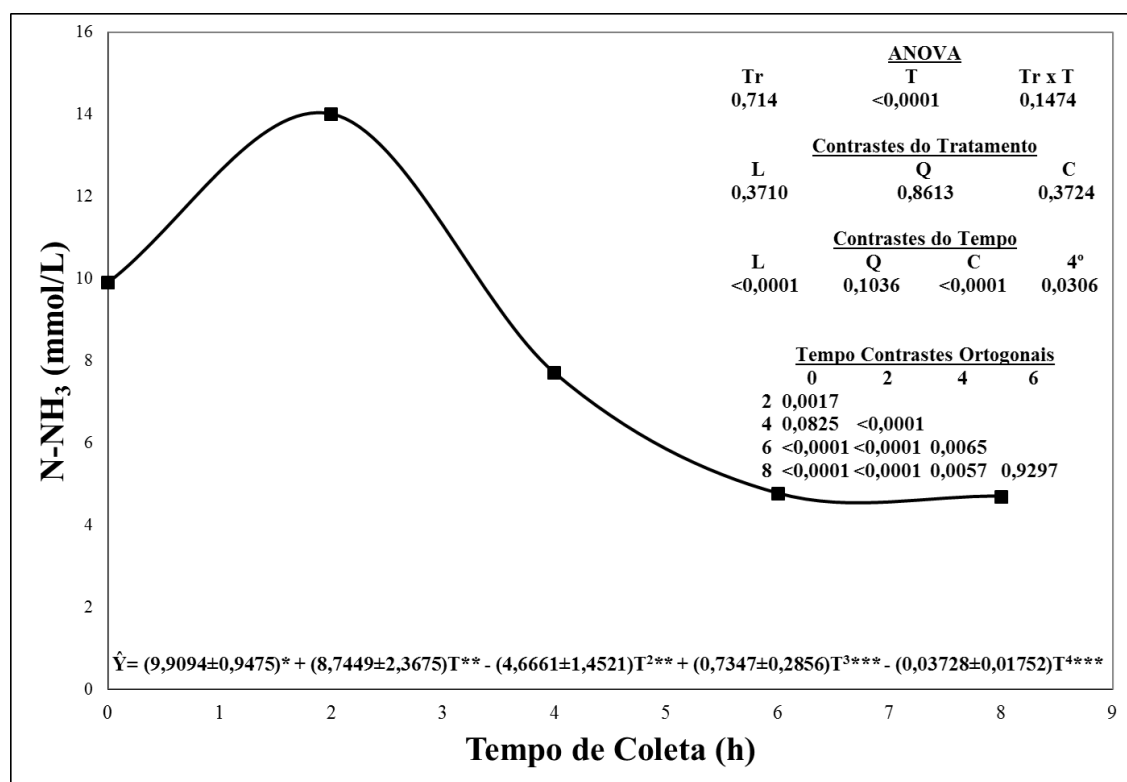


Figura 4 – Concentração de N-NH₃ em cabras fistuladas, não lactantes, alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.

*significativo ao nível de 0,0001 de probabilidade; **significativo ao nível de 0,001 de probabilidade; ***significativo ao nível de 0,05 de probabilidade.

As concentrações relativas de acetato, propionato e butirato em mM (Tabela 8) indicam que as dietas com adição de FVA resultaram em maiores valores de concentração de acetato em relação ao propionato. As concentrações de AGV, total ou individual no rúmen, são altamente variáveis e dependem da frequência de alimentação, tempo após a alimentação e composição da dieta. No presente trabalho, foi obtida uma proporção relativa dos AGV produzidos de 69: 20: 11 (moles de acetato: propionato: butirato). Essa proporção está próxima a 65: 15: 10 para dietas com altas proporções de forragens (OWENS e GOETSCH, 1993).

Houve efeito cúbico significativo dos níveis de substituição de FVA sobre a relação acetato: propionato, sendo a menor relação encontrada para o nível de substituição de 33,3%. Este relato corrobora com a hipótese de Argôlo et al. (2010) de que o uso de algaroba reduz a relação acetato: propionato no líquido ruminal.

Tabela 8 – Médias de quadrados mínimos, erro padrão da média e indicativos de significância para os efeitos dos contrastes das concentrações de acetato, propionato, butirato em cabras alimentadas com concentrado contendo farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho.

Item	Níveis de Farelo de Vagem de Algaroba (%MN)				EPM	Efeito [♦]		
	0	33,3	66,7	100		L	Q	C
Acetato (mM)	17,96	13,43	17,54	14,84	1,45	0,70	0,77	0,29
Propionato (mM)	4,52	4,66	5,27	4,35	0,40	0,98	0,55	0,61
Butirato (mM)	2,40	2,69	2,60	2,55	0,24	0,85	0,76	0,89
Relação Acetato: Propionato (mM)	4,04	2,85	3,28	3,47	0,18	0,52	0,06	0,05 ¹

[♦]L, Q e C – efeito linear, quadrático e cúbico.

¹ $\hat{Y} = 4,0418^* - 0,07894Tr^{***} + 0,0016Tr^2^{***} - 8,43^{-6}Tr^3^{***}$

*significativo (P<0,0001); **significativo (P<0,001); ***significativo (P<0,05).

Na Figura 5, a soma dos dois primeiros componentes explica os 86,57% da variação dos dados para os parâmetros fermentativos, mostrando que o eixo horizontal (CP 1) é o mais importante para a interpretação dos resultados por explicar a maior parte da variação dos dados. Observa-se que ocorreu um deslocamento do tratamento 0% para a parte negativa do gráfico em CP 1, indicando que este tratamento apresenta diferenças em relação aos demais. O CP 1 mostra a separação dos tratamentos com FVA (33,3; 66,7 e 100%) e sem FVA (0%) em substituição ao milho. As variáveis com correlações positivas que mais influenciaram a discriminação dos tratamentos à direita do gráfico em CP 1 foram, nesta ordem, Bt, pH, N-NH3 e Pr, e aquelas com correlações negativas foram responsáveis pela discriminação do tratamento 0% à esquerda em CP 1, quais foram, A:P, Ac, na ordem (Figura 5) (Tabela 9). O tratamento com 66,7% de substituição do milho pelo FVA aparece afastado dos demais tratamentos, deslocando-se positivamente ao longo do eixo Y, com os outros níveis de substituição (0; 33,3 e 100%),

deslocando-se em sentido oposto. O CP 2 foi responsável, em 33,20% da variação dos dados, principalmente pelo deslocamento do tratamento 66,7% de FVA, influenciado pelas variáveis com correlação positiva, Pr, Ac, N-NH₃, na ordem.

A DGGE é normalmente utilizada para determinar o número ou diferenças entre gêneros ou espécies de bactérias presentes na amostra. Neste trabalho, foi possível observar diferenças entre os padrões de bandas dos produtos de PCR, tanto para o domínio *Bacteria* quanto *Archaea*, demonstrado pelo número e intensidades diferentes de bandas que, possivelmente, trata-se de espécies distintas. Os padrões de bandas, obtidos mediante a DGGE, foram utilizados para auxiliar na análise da estrutura das comunidades de microrganismos. A estimativa foi realizada pela análise de agrupamento do tipo *cluster*, a partir de uma matriz de dados de presença e ausência das bandas, verificadas em cada amostra (Figura 6) (Figura 9).

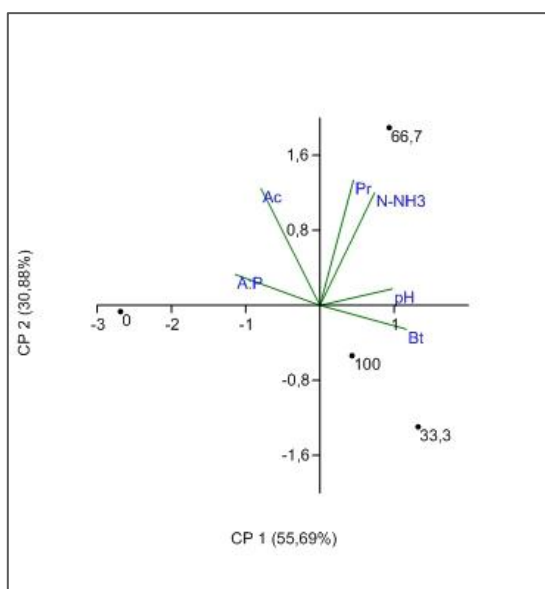


Figura 5 – Gráfico Biplot resultante da análise de componentes principais (CP) mostrando a distribuição dos tratamentos e dos parâmetros de fermentação.
Em que: N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; Ac – acetato; Pr – propionato; Bt – butirato; A:P – relação acetato: propionato.

Tabela 9 – Correlação entre variáveis de parâmetros fermentativos e cada componente principal (CP).

	pH	N-NH ₃	Ac	Pr	Bt	A:P
CP 1	0,44	0,33	-0,35	0,20	0,52	-0,51
CP 2	0,08	0,54	0,56	0,60	-0,12	0,15

N-NH₃ – nitrogênio amoniacal; Ac – acetato; Pr – propionato; Bt – butirato; A:P – relação acetato: propionato.

O dendograma Raup-Crick (Figura 6), gerado a partir de DGGE, utilizando iniciadores para a região V3 do 16S do rRNA, para bactérias ruminais, e considerando apenas os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%), o ponto de união de todos os grupos apresenta similaridade de aproximadamente 50%, mostrando uma alta similaridade (88%) entre os tratamentos 0 e 33,3% de FVA, em substituição ao milho, o que pode ser explicado pela semelhança entre os dois ambientes ruminais. Já os outros tratamentos apresentaram menor índice de similaridade. O diagrama de Venn demonstra claramente o agrupamento de bandas (espécies), que podem ser compartilhadas ou específicas de cada “grupo amostrado”. Na Figura 7, pode-se observar que os tratamentos 0 e 33,3% e 66,7 e 100% compartilharam a mesma quantidade de bandas, 3 bandas, demonstrando, assim, similaridade em termos de distribuição de espécies.

Os componentes da dieta e as mudanças no comportamento ingestivo podem causar alterações na ecologia microbiana gastrointestinal que desempenham um papel fundamental sobre a saúde animal e sua produtividade. À medida que houve inclusão de FVA nas dietas de cabras mestiças Anglo Nubianas, observou-se um aumento de FDN nas dietas em função do aumento nos níveis de substituição (51,83; 52,85 e 53,65%), embora não tenha sido evidenciado esse aumento no consumo de FDN, sugere-se que elevações no teor de FDN da dieta promoveram aumento no tempo gasto com mastigação (TMT), acarretando aumento no pH ruminal, como resultado do maior fluxo de saliva para o rúmen, e elevando o fluxo de substâncias tamponantes.

O pH ruminal está inteiramente relacionado com os produtos finais da fermentação, bem como com a taxa de crescimento dos microrganismos ruminais (YOKOYAMA e JOHNSON, 1988), logo, o pH é o principal fator “ambiental” na distribuição dos organismos, exercendo um papel regulador na definição do ambiente e diversidade de microrganismos, estando correlacionado positivamente com o nitrogênio amoniacal e relação acetato: propionato. Esse fato reflete-se nitidamente sobre a riqueza de bandas para bactérias, na qual se observa que o tratamento de 33,3% de substituição, que possui o menor valor de pH 4 horas após a alimentação, é também o que apresenta uma menor diversidade bacteriana (Figura 8) e menor número de bandas raras (Figura 7).

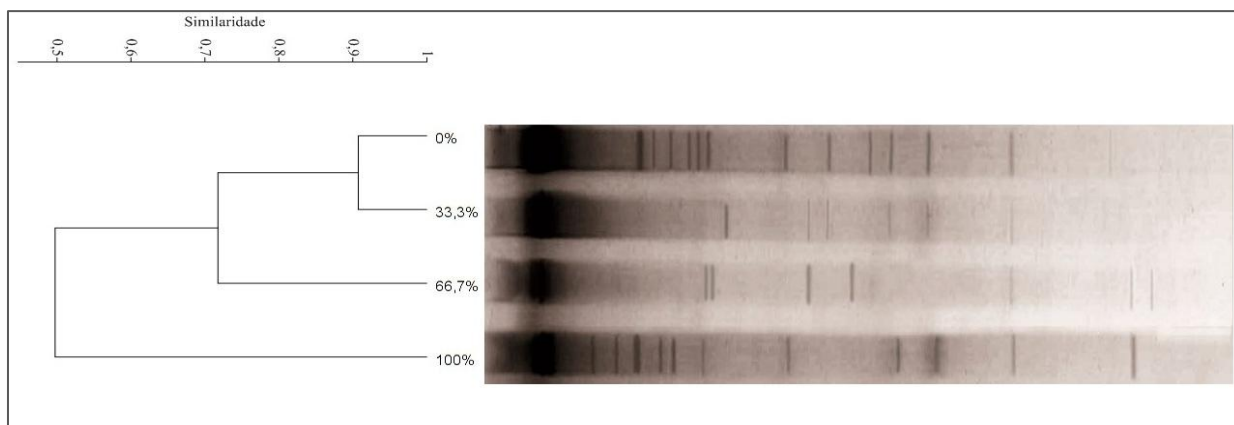


Figura 6 - Dendrograma Raup-Crick gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com iniciadores 16S V3 para bactérias, representando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).

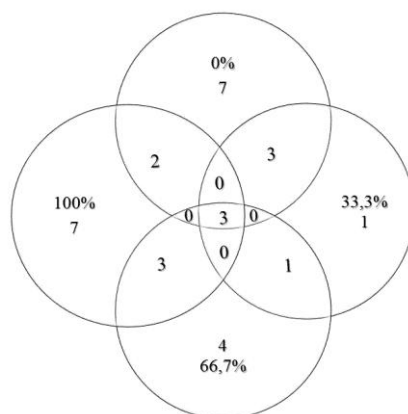


Figura 7 – Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para bactérias, considerando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).

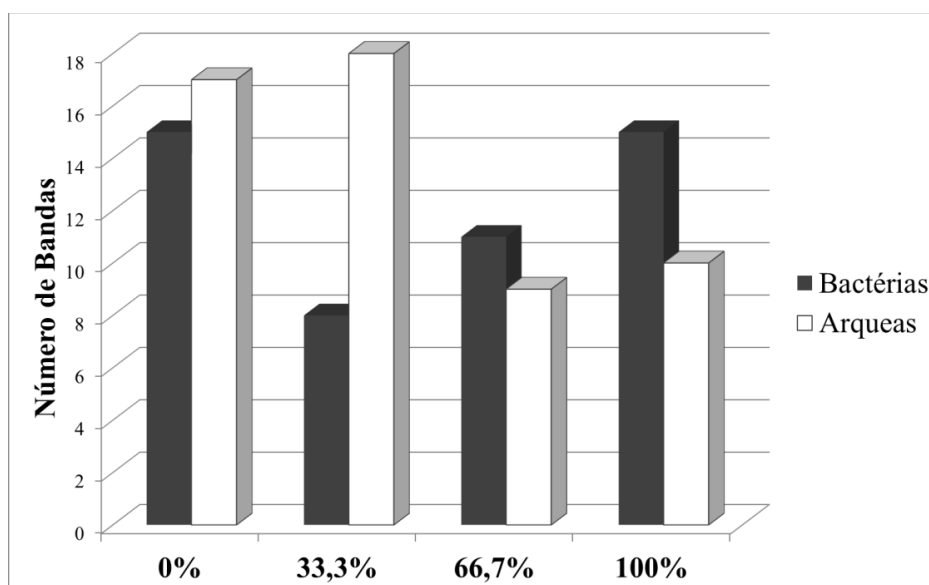


Figura 8 – Riqueza de bandas para bactérias e arqueas considerando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).

Igualmente para o domínio *Archaea*, foi gerado dendograma Raup-Crick (Figura 9) a partir de DGGE com iniciadores específicos para arqueas, o ponto de união de todos os grupos apresenta baixa similaridade em torno de 0,08%. Ao avaliar os tratamentos, 0; 33,3; 66,7 e 100% de substituição do milho pelo FVA, obteve-se o dendograma representado na Figura 9 e o diagrama de Venn (Figura 10).

Visualiza-se que entre os níveis 66,7 e 100% de farelo de vagem de algaroba em substituição ao milho, houve maior similaridade entre si, 96,2%. Esta observação é claramente confirmada por meio das análises Biplot aplicadas aos Componentes Principais, discutidas anteriormente, que evidencia as mesmas variáveis, exercendo influência sobre o ambiente ruminal das cabras mestiças que receberam tais níveis de FVA, e ainda refletindo sobre a riqueza de espécies geradas pelo perfil de bandas no DGGE de arqueas, que aponta para uma menor diversidade de espécies para esses dois níveis de substituição (Figura 8),(Figura 10).

A dieta fornecida com 66,7 e 100% de substituição do milho pelo FVA foram os tratamentos que apresentaram menor número de arqueas metanogênicas, possivelmente, este fato pode estar relacionado a uma redução de protozoários para esses tratamentos do que nos outros níveis de substituição, o que levou a uma redução das metanogênicas associadas a estes microrganismos por aderência ou endossimbiose (MOSS, 1993; TOKURA et al., 1999). Nestes tratamentos, foram observados os maiores teores de N-NH₃ (10,24 e 8,32 mmol/ L, respectivamente, 4 horas após a alimentação). Ainda existindo um sinergismo entre os níveis de acidez (pH), por meio deles, é possível aumentar a eficiência microbiana, maior produção de massa microbiana e a degradação da fibra do alimento, obtendo-se, assim, maior consumo de alimentos. Essas alterações no ambiente ruminal foram suficientes para reduzir a população de arqueas metanogênicas, sugerindo também um desvio do hidrogênio no meio para produção de propionato, como visualizado no tratamento que recebeu 66,7% de FVA em substituição ao milho (Tabela 8).

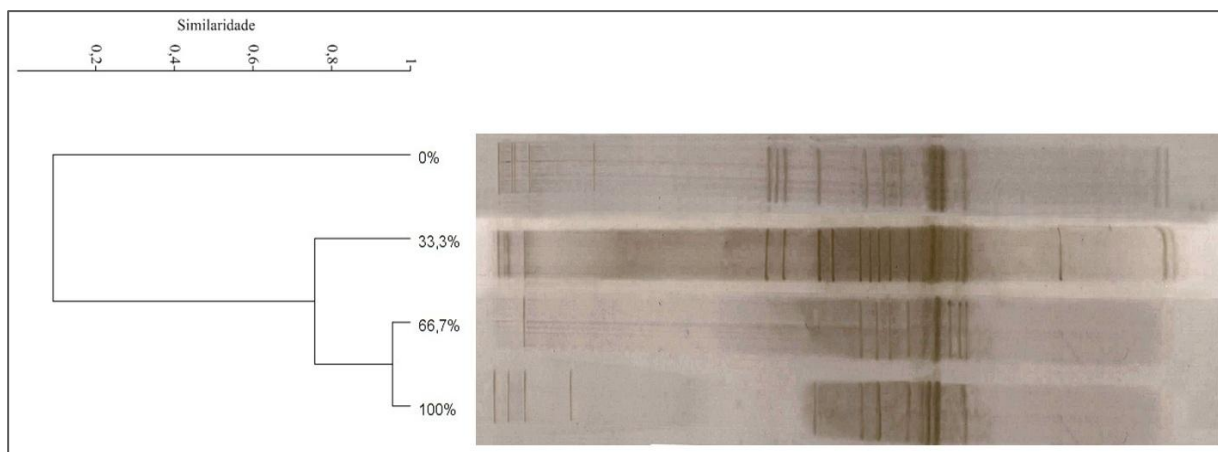


Figura 9 - Dendrograma Jaccard gerado a partir da DGGE de fragmentos amplificados com *primers* específicos (1100 e 1400 do 16S rRNA) de arqueas, representando apenas os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).

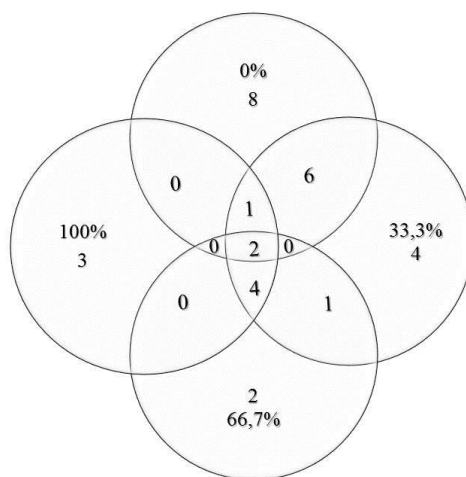


Figura 10 – Diagrama de Venn gerado a partir do perfil de bandas da DGGE para arqueas, considerando os níveis de substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba (0; 33,3; 66,7 e 100%).

4 CONCLUSÕES

A substituição do milho pelo farelo de vagem de algaroba em concentrados associados à silagem de capim-elefante aumenta o tempo de ruminação e o número de mastigações em cabras não lactantes, porém, reduz a eficiência de ruminação de matéria seca e de fibra em detergente neutro por diminuir suas quantidades no bolo regurgitado.

A concentração de amônia no rúmen variou com o tempo decorrido da alimentação, sendo observado maior valor duas horas após alimentação e menor valor entre seis e oito horas após alimentação da manhã, sem sofrer influência dos níveis de farelo de algaroba. A variação horária do pH no rúmen de cabras entre a primeira e segunda alimentação apresentou comportamento cúbico, sendo que seus valores se elevam em função do nível de substituição do milho pelo farelo de algaroba. A adição de algaroba reduz a relação acetato: propionato no líquido ruminal.

A utilização do farelo de vagem de algaroba altera-se nos níveis 33,3 % e 66,7 % de substituição do milho pelo farelo de algaroba na população bacteriana no rúmen de cabras mestiças, ocorrendo redução da população de arqueas presentes no fluido ruminal de cabras alimentadas com até 66,7% de substituição.

5 REFERÊNCIAS

- ANDRADE-MONTEMAYOR, H.M.; CORDOVA-TORRES, A.V.; GARCÍA-GASCA, T. KAWAS, J.R. Alternative foods for small ruminants in semiarid zones, the case of Mesquite (*Prosopis laevigata* spp.) and Nopal (*Opuntia* spp.). **Small Ruminant Research**. v.98, p.83–92. 2011.
- AQEEL, A.; KHURSHEED, A.K.; VIQARUDDIN, A.; SABIHA, Q. Antimicrobial activity of julifloricine isolated from *Prosopis juliflora*. **Arzneimittelforschung**. v.39, n.6, 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. Farelo 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.
- BHATTA, R.; VAITHIYANATHAN, S.; SINGH, N.P.; VERMA, D.L. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. **Small Ruminant Research**. v.67, p. 75-83. 2007.
- CARVALHO, G.G.P.; PIRES, A.J.V.; SILVA, F.F.; VELOSO, C.M.; SILVA, H.G.O.; BONOMO, P.; MENDONÇA, S.S. Comportamento ingestivo de cabras leiteiras alimentadas com farelo de cacau ou torta de dendê. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, n.9, p.919-925, 2004.
- CARVALHO, S.; RODRIGUES, M.T.; BRANCO, R.H. et al. Comportamento ingestivo de cabras Alpinas em lactação alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro proveniente da forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.2, p.562-568. 2006.
- CHURCH, D.C. **El ruminat: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia. 1988. 641p.
- CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM - CNCPS. version 5.0.18. Ithaca: Cornell University. 2002. (*software*).
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, J.A.G. (eds.). **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema. 214p. 2012.
- EARDMAN, R.A.; PROCTOR, G.H.; VANDERSALL, J.H. Effect of rumen ammonia concentration on 'in situ' rate and extent of digestion of foodstuffs. **Journal of Dairy Science**. v.29, n.9, p.2312-2320. 1986.
- ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1771. 1961.
- FIGUEIREDO, M.P.; CRUZ, P.G.; COSTA, S.S.; RODRIGUES, C.S.; PEREIRA, L.G.R.; FERREIRA, J.Q.; SOUSA, F.G.; IRMÃO, J.N. Fracionamento dos carboidratos e componentes nitrogenados do farelo e diferentes partes integrantes da vagem de algaroba (*Prosopis juliflora* (Swartz D.C.)). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.8, n.1, p.24-31. 2007.

- GONÇALVES, A.L.; LANA, R.P.; RODRIGUES, M.T.; VIEIRA, R.A.M.; QUEIROZ, A.C.; HENRIQUE, D.S. Padrão nictemeral do pH ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.6, p.1886-1892. 2001.
- HALL, M.B.; HOOVER, W.H.; JENNINGS, J.; WEBSTER, T.K.M. A method for partitioning neutral detergent soluble carbohydrates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.79, n.15, p.2079-2086. 1999.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**. v.37, p.547-579. 1901.
- KOZDRÓJ, J.; ELSAS, J. D. Van. Structural diversity of microbial Communities in arable soils of a heavily industrialised área determined by PCR-DGGE fingerprint and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**. v. 17, p. 31-42. 2001.
- KUDO, Y; NAKAJIMA, T.; MIYAKI, T.; OYAIZU, H. **FEMS Microbiology Ecology**. v.22, p.39-48. 1997.
- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research and Review**. v.3, p.277-303. 1990.
- LIMA, P. Leucena. *In*: KILL, L.H.P.; MENESES, E. A. (eds.). **Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o Semi-Árido Brasileiro**. Brasília, DF: Embrapa Semiárido; Embrapa informação tecnológica. p.158-205. 2005.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. **SAS[®] system for mixed models**. Cary, 633p. 1996.
- LITTELL, R.C.; MILLIKEN, G.A.; STROUP, W.W. et al. **SAS[®] system for mixed models**. 2nd Edition, Cary, 824p. 2006.
- MOSS, R.A. **Methane: global warming and production by animals**. Chalcombe Publications, Canterbury. 105p.
- MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59, n.3, p.695-700. 1993.
- 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, p.587-591. 2004a.
- NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw) D.C.). **Plant Growth Regulation**. v.44, p.207-210.2004b.
- OLIVEIRA, C.A.S. **Farelo da vagem de algaroba em dietas para cabras em lactação**. 2009. 48p. Dissertação (Mestrado). Itapetinga, BA. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.
- OWENS, F.N.; GOETSCH, A.L. Ruminant fermentation. *In*: CHURCH, D.C. (ed.). **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. 1993. p.145-171.

- PEREIRA, T.C.J.; PEREIRA, M.L.A.; ALMEIDA, P.J.P.; PEREIRA, C.A.R.; SANTOS, E.J.; SANTOS, A.B. Mesquite pod meal in diets for Santa Inês sheep: ingestive behavior. **Acta Scientiarum. Animal Science** (no prelo).
- RAUP, D.; R.E. CRICK. Measurement of faunal similarity in paleontology. **Journal of Paleontology**. v.53, p.1213-1227. 1979.
- RUSSELL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. **Science**. v.292, p.1119-1122. 2001.
- 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.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**. v.32, n.2, p.199-208. 1974.
- SAWAL, R.K.; RATAN, R.; YADAV, S.B.S. Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource livestock – A Review. **Asian-Australasian Journal Animal Science**. v.17, n.5, p.719-725. 2004.
- SHEFFIELD, V.C.; COX, D.R.; LERMAN, L.S.; MYERS, R.M. Attachment of a 40-base-pair G + C - rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of National Academy of Science**. v.86, n.1, p.232-236. 1989.
- SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J.; FOX, D.G.; RUSSELL, J.B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. v.70, n.11, p.3562-3577. 1992.
- TOKURA, M.; CHANGAN, I.; USHIDA, K.; KOJIMA, Y. Phylogenetic study of methanogens associated with rumen ciliates. **Current Microbiology**. v.39, p.123-128. 1999.
- TSAI, Y.; OLSON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**. v.58, p.2292-2295. 1992.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2 ed. Ithaca: Cornell University Press. 1994. 476p.
- VAUGHAN, E.E.; SCHUT, F.; HEILIG, H.G.H.J.; ZOETENDAL, E.G.; de VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D.L. A molecular view of the intestinal ecosystem. **Current Issues in Intestinal Microbiology**. v.1, n.1, p.1-12. 2000.
- VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminantes**. 1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Viçosa – Universidade Federal de Viçosa.
- YOKOYAMA, M.T.; JOHNSON, K.A. Microbiología del rumen e intestino. *In*: CHURCH, D.C. (ed.). **El Ruminant Fisiología Digestiva e Nutrición**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1988. cap.7, p. 137-157.

ANEXO E
DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO AMONICAL
Modificado de VIEIRA et al. (1980).

APARATOS

- Balança analítica
- Centrífuga
- Frascos tipo Falcon com tampa
- Micropipeta e ponteiras
- Pipeta
- Béqueres com capacidade para 250 mL
- *Erlenmayers* de 250 mL
- Destilador de Nitrogênio
- Bureta de 50 mL com graduação de 0,1 mL ou inferior

SOLUÇÕES

I. Solução de Hidróxido de Potássio (2 N)

- Dissolva em *erlenmayer* de 1000 mL, 112,22 g de KOH P.A. e complete o volume com água destilada.

II. Solução de Ácido Bórico (40 g/L)

- Dissolva em um balão volumétrico de 1000 mL, com cerca de 500 mL de água destilada, 40 g de ácido bórico P.A. Adicione 8 mL de solução alcoólica de vermelho de metila. Agite e complete o volume com água destilada.

III. Solução Alcoólica de Vermelho de Metila (1 g/L)

- Em um balão de 100 mL com cerca de 60 mL de álcool etílico anidro (absoluto) dissolva 0,1 g de vermelho de metila. Complete o volume com etanol e homogeneíze a solução.

IV. Solução-Padrão de Ácido Clorídrico a 0,008 N

- Dilua 0,6 mL de HCl P.A. em balão volumétrico de 1000 mL, contendo em média 500 mL de água destilada. Deixe esfriar, complete o volume e homogeneíze a solução.

PROCEDIMENTO

1. Lave os tubos de proteína e deixe secar em estufa não ventilada;
2. Amostras previamente filtradas em quatro camadas de gaze, acidificadas com 1,0 mL de ácido sulfúrico (20%) e congeladas a 20°C negativos, devem ser descongeladas em temperatura ambiente;
3. Adicionar 10,0 mL das amostras em tubos tipo Falcon, separar o sobrenadante por centrifugação a 5000 rpm (rotação por minuto) durante 10 minutos e manter sob refrigeração até o momento das análises;
4. Pipetar uma alíquota de 2,0 mL do sobrenadante;
5. Adicionar aos tubos de digestão 5,0 mL de hidróxido de potássio (KOH) 2 N e água destilada até um volume aproximado de 20,0 mL;
6. Adaptar recipiente contendo 10,0 mL de ácido bórico, para receber o destilado;
7. Destilar por 3 a 4 minutos, até um volume de aproximadamente 100,0 mL;
8. Retire o *erlenmayer* e titule com solução de ácido clorídrico (0,008 N) até a viragem do indicador (verde para rosa claro).

CÁLCULO DO PERCENTUAL DE N-NH₃/ N-TOTAL

$$\% \text{ N amoniacal} = \frac{\text{mL HCl} \times \text{N HCl} \times \text{fc} \times 0,014 \times 100}{\text{V}}$$

$$\text{N amoniacal (mg/dL)} = \% \text{ N amoniacal} \times 1000$$

Em que:

mL HCl = volume de ácido gasto na titulação;

N HCl = normalidade do ácido utilizado na titulação;

fc = fator de correção do ácido utilizado na titulação; e

V = volume da alíquota.