



**NÍVEIS DE EXTRATO ALCALOÍDICO DE  
ALGAROBA COMO ADITIVO ALIMENTAR EM DIETA  
DE VACAS LACTANTES**

**DIEGO SANTANA COSTA**

**2022**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**NÍVEIS DE EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA COMO ADITIVO  
ALIMENTAR EM DIETA DE VACAS LACTANTES**

Autor: Diego Santana Costa

Orientador: Prof.<sup>a</sup> DSc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Fevereiro de 2022

**DIEGO SANTANA COSTA**

**NÍVEIS DE EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA COMO  
ADITIVO ALIMENTAR EM DIETA DE VACAS LACTANTES**

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> DSc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Coorientadores: DSc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira  
Prof. DSc. Fabiano Ferreira da Silva

ITAPETINGA  
BAHIA – BRASIL  
Fevereiro de 2022

636.085 Costa, Diego Santana.  
C871n Níveis de extrato alcaloídico de algaroba como aditivo alimentar em dieta de vacas lactantes. / Diego Santana Costa. – Itapetinga-BA: UESB, 2022. 68f.

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Profª. D. Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira e coorientação do Prof. D. Sc. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira e Prof. D. Sc. Fabiano Ferreira da Silva.

1. Vacas lactantes - Extrato alcaloídico de algaroba - Dieta. 2. Vacas lactantes - Algaroba – Aditivo – Consumo. 3. Vacas lactantes - Algaroba – Desempenho – Produção de leite. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Pereira, Luiz Gustavo Ribeiro. IV. Silva, Fabiano Ferreira da. V. Título.

**CDD(21): 636.085**

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região  
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Vacas lactantes – Dieta – Manejo alimentar
2. *Prosopis juliflora* - Extrato alcaloídico
3. Algaroba - Extrato alcaloídico - Dieta – Vacas lactantes

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

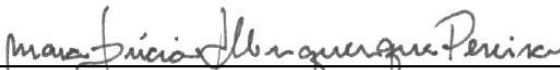
**Título:** “Níveis de extrato alcaloídico de algaroba como aditivo alimentar em dieta de vacas lactantes”.

**Autor (a):** Diego Santana Costa

**Orientador (a):** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

**Coorientador (a):** Prof. Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

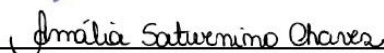
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



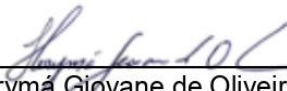
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mara Lúcia Albuquerque Pereira - UESB  
Orientadora



Prof. Dr. Luiz Gustavo Ribeiro Pereira - EMBRAPA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amália Saturnino Chaves - UFJF



Prof. Dr. Heryma Giovane de Oliveira Silva - UESB



Prof. Dr. Fabiano Ferreira da Silva - UESB

Data de realização: 23 de fevereiro de 2022.

Para além das ideias de certo e errado, existe um campo. Eu me encontrarei com você lá.

Rumi

Aos meus pais, Shirley e Rafael.

Ao meu irmão Thullio.

**DEDICO....**

## AGRADECIMENTOS

*Ao divino mestre Jesus, assim como, aos benfeitores espirituais, por todo amparo!*

*À minha família pelo apoio em todos os momentos.*

*Aos meus amigos Tarcísio Logrado e Leda Miranda e família pela confiança depositada.*

*Ao PPZ/UESB e Embrapa gado de leite pela oportunidade de realização desse curso.*

*À CAPES e FAPESB pelo suporte financeiro para desenvolvimento desse estudo.*

*À minha orientadora Mara Lúcia pela oportunidade de confiar-me parte desse trabalho.*

*Ao co-orientador Luiz Gustavo, pelo acolhimento e empenho na execução da pesquisa na Embrapa.*

*Ao Thierry, Fernanda Samarini e João Sacramento pelos ensinamentos e orientações para desenvolvimento das atividades na Embrapa, sobretudo com a respirometria.*

*Aos prof<sup>s</sup>. Herymá, Fabiano, Amália Saturnino (UFJF), Vanderlúcia e Simone (UESB), pelas contribuições em diferentes momentos da condução da pesquisa.*

*Karen Brigitte pela amizade e oportunidade de compartilhar a experiência de juntos desenvolvermos nossos trabalhos de pós-graduação.*

*Rebeca, Layanne e Abias amigos originários da Embrapa e que sempre levarei comigo.*

*Laís e Ed pela amizade e convivência (UFMG/UESB/EMBRAPA).*

*Aos contemporâneos do NUPENF: Larisse, Palas, Thamiris, Virgínia, George, Eliseu Cleiton, Hélio, Joice, Maicon, Leandro's, Joanne, Karine, "Samantha", Erick, Ana Cristina, Keven, Bia, Gleisson, Amanda e Bruna.*

*Aos Estagiários da Embrapa: Brenda, Carol Weber, Wantuir, Weslen, Hysla, Caio, Carlos H., Lucas, Vinícius e Jhenifer.*

*Aos funcionários da EMBRAPA pela contribuição na execução do experimento: Paulo Rosa, Dodó, Tetesco, Mengo, Verônica, Gilmar, Do Carmo, Marcão, Clebinho, Marquinhos, Geovane, Gilmarzinho, Chico Tostes e aos Zé's (Fininho, Moreira, Luís e da Cruz).*

*As secretárias do PPZ/UESB, Raquel e Roberta pela atenção e empenho.*

*Aos Embrapianos 2018/2019: Luiz Felipe, Miss Gisele, Paty, Naty, Fred, Rafael, Jennifer, Leticia, Natália, "Taioba", Morgana, Renata, Gilson, Edja, Fernando, Hilton, Sabrina, Douglas, Karine, Sirley...*

*À Escola Família Agrícola Bontempo que além dos ensinamentos convencionais e técnicos, vieram os valores e deveres antropológicos que tenho levado comigo.*



*Enfim, grato a todos que contribuíram na condução de mais essa etapa da minha caminhada.*

## BIOGRAFIA

DIEGO SANTANA COSTA, filho de Shirley Santana e Rafael Arcanjo, nasceu em Taiobeiras, Minas Gerais.

Em 2007, concluiu o curso técnico em Agropecuária na Escola Família Agrícola Bontempo em Itaobim, MG.

Em 2010, iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de São João Del Rey - UFSJ.

Em 2011, transferiu-se para a Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Instituto de Ciências Agrárias campus Montes Claros, sob a orientação da Professora DSc. Luciana Castro Geraseev, e concluiu em 12 de dezembro de 2014 obtendo o título de “Zootecnista”.

Em 2015, iniciou o curso de Pós-Graduação em Produção Animal stricto sensu, em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Instituto de Ciências Agrárias, campus Montes Claros, sob a orientação das Professoras DSc. Luciana Castro Geraseev e Amália Saturnino. Foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e em 12 de dezembro de 2016 defendeu a Dissertação para obter o título de “Mestre em Produção Animal”.

Em 2017, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia stricto sensu, em nível de Doutorado, pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB campus Itapetinga, sob a orientação da Professora DSc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira. Foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e em 23 de fevereiro de 2022 defendeu a referida Tese para obter o título de “Doutor em Zootecnia”.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
I-REFERENCIAL TEÓRICO.....	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 Uso de aditivos naturais para ruminantes.....	2
1.3 Alcaloides piperidínicos de <i>prosopis juliflora</i> na dieta de ruminantes.....	3
1.4 Calorimetria indireta – <i>conceito e princípios básicos</i> .....	6
1.5 Emissão de metano entérico por ruminantes.....	7
1.5.1 Formação de metano entérico no ecossistema ruminal.....	7
1.5.2 Uso de extrato alcaloídico de <i>Prosopis juliflora</i> na mitigação de metano entérico.....	8
Referências.....	10
II – OBJETIVOS.....	18
2.1 - Objetivo geral.....	18
2.2 - Objetivos específicos.....	18
III - CAPÍTULO I - Níveis de extrato alcaloídico de algaroba em dieta com caroço de algodão afetam metabolismo de energia e respostas de produção de vacas lactantes.....	19
Resumo.....	19
Abstract.....	20
1 - Introdução.....	21
2 - Material e métodos.....	22
2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal.....	22
2.2 Obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba.....	23
2.3 Animais, dietas e delineamento experimental.....	24
2.4 Consumo e digestibilidade.....	26
2.5 Desempenho de produção.....	27
2.6 Balanço de nitrogênio .....	27
2.7 Processamento de amostras e análises bromatológicas .....	28
2.8 Determinação e Partição energética.....	29
2.9 Análise estatística.....	30
3 - Resultados.....	30
4 - Discussão.....	34
5 - Conclusões.....	37
6 - Referências.....	38

IV – CAPÍTULO II - Níveis de extrato alcaloídico de algaroba em dieta com caroço de algodão para vacas lactantes afetam a composição de ácidos graxos do leite e o rendimento de metano.....	45
Resumo.....	45
Abstract.....	46
1 - Introdução.....	47
2 - Material e métodos.....	48
2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal.....	49
2.2 Obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba.....	49
2.3 Animais, dietas e delineamento experimental.....	50
2.4 Síntese de proteína microbiana.....	52
2.5 Parâmetros ruminais.....	53
2.6 Perfil de ácidos graxos no leite.....	54
2.7 Respirimetria.....	54
2.8 Manejo dos animais na câmara respirométrica.....	55
2.9 Análise estatística.....	56
3 - Resultados.....	57
4 - Discussão.....	59
5 - Conclusões.....	64
6 - Referências.....	65

## LISTA DE TABELAS

		Página
Capítulo I		
Tabela - 1	Alcaloides piperidínicos identificados a partir de ECB de vagens de <i>Prosopis juliflora</i> .....	24
Tabela - 2	Composição da ração mista total (RMT).....	25
Tabela - 3	Médias de consumo de MS, nutrientes, energia e água em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	32
Tabela - 4	Produção e composição do leite e eficiência alimentar de vacas leiteiras alimentadas com diferentes níveis de APA.....	33
Tabela - 5	Parâmetros de balanço de compostos nitrogenados em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis crescentes de APA.....	33
Tabela - 6	Partição e índices de eficiência energética em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	34
Capítulo II		
Tabela - 1	Alcaloides piperidínicos identificados a partir de ECB de vagens de <i>Prosopis juliflora</i> .....	50
Tabela - 2	Composição e perfil de ácidos graxos da ração mista total (RMT)....	51
Tabela - 3	Médias de consumo, pH, concentrações de NH <sub>3</sub> , AGCC em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	57
Tabela - 4	Derivados de Purina e eficiência de síntese microbiana em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	58
Tabela - 5	Produção de leite e $\Sigma$ de ácidos graxos presentes na gordura do leite em vacas alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	58
Tabela - 6	Consumo, trocas gasosas, quociente respiratório, produção de calor e produção de metano por vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	59
Tabela - 7	Produção e rendimento de metano por vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOH	Ácido acético
AFRC	Agricultural and Food Research Council
AG	Ácido graxo
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGI	Ácido graxo insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AGV's	Ácidos graxos voláteis
AOAC	Association Official Agricultural Chemists
APA	Alcaloides piperidínicos de algaroba
BE	Balanco energético
BN	Balanco de nitrogênio
CA	Conversão alimentar
CCNF	Consumo carboidratos não fibrosos
CEB	Consumo de energia bruta
CEE	Consumo extrato etéreo
CEM	Consumo energia metabolizável
CFDA	Consumo de fibra em detergente ácido
CFDN	Consumo de fibra em detergente neutro
CH <sub>4</sub>	Metano
CLA	Ácidos linoléico conjugado
CMO	Consumo de matéria orgânica
CMS	Consumo de matéria seca
CNA	Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil
CNDT	Consumo de nutrientes digestíveis totais
CNF	Carboidratos não fibrosos
CNFCP	Consumo carboidratos fibrosos corrigidos para cinzas e proteína
CNFD	Carboidratos não fibrosos digestíveis
CNPGl	Centro nacional de pesquisa de gado de leite
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPB	Consumo de proteína bruta
CR	Coeficiente respiratório
CT	Carboidratos totais
DPT	Derivados de purinas totais
EA	Eficiência alimentar
EB	Energia bruta
EC	Excreção de creatinina
ECB	Extrato clorofórmico básico de algaroba
ED	Energia digestível
EE	Extrato etéreo
EEB	Extrato etanólico bruto de algaroba
EED	Extrato etéreo digestível

EL	Energia líquida
ELL	Energia líquida de lactação
EM	Energia metabolizável
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAME	Ésteres metílicos dos ácidos graxos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FDN	Fibra em detergente neutro
FDN <sub>cp</sub>	Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína
FDND	Fibra em detergente neutro digestível
FDN <sub>i</sub>	Fibra em detergente neutro indigestível
GEE	Gases de efeito estufa
H	Produção de calor
H <sub>2</sub> O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Incremento calórico
IMS	Ingestão de matéria seca
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
N <sub>2</sub> O	Óxido nítrico
NDT	Nutrientes digestíveis totais
NIDA	Nitrogenados insolúveis nos detergentes ácido
NIDN	Nitrogenados insolúveis nos detergentes neutro
NM	Nitrogênio microbiano
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio amoniacal
NRC	National Research Council
NU	Nitrogênio urinário
PA	Purinas absorvidas
PB	Proteína bruta
PBD	Proteína bruta digestível
PC	Peso corporal
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIB	Produto interno bruto
PL	Produção de leite
P <sub>mic</sub>	Proteína microbiana
SAA	Solução aquosa ácida
SAB	Solução aquosa básica
SAS	Statistical Analysis System

## RESUMO

COSTA, Diego Santana. **Níveis de extrato alcaloídico de algaroba como aditivo alimentar em dieta de vacas lactantes**. Itapetinga, BA: UESB, 2020. 70p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).\*

Objetivou-se, com esse estudo, avaliar os efeitos de níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) na dieta de vacas lactantes sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite, balanço de nitrogênio e de energia, metabolismo ruminal, perfil de ácidos graxos do leite, trocas gasosas e rendimento de metano entérico. As dietas experimentais consistiram em: dieta controle sem aditivo; com APA 5, 10 e 15 mg/kg de matéria seca (MS). Foram utilizadas quatro vacas primíparas da raça Holandês e quatro múltiparas Girolando (3/4 Holandês x 1/4 Gir), alojadas em galpão *free stall*, com peso corporal médio de  $576,5 \pm 70$  kg, com produção de leite média diária de  $20,7 \pm 2,2$  kg e média de  $132,8 \pm 25,7$  dias em lactação. Foram distribuídas em dois quadrados latinos balanceados (4 x 4), em um período experimental de 84 dias, divididos em 4 períodos de 21 dias, com 15 dias de adaptação e 6 para coleta de amostras. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo SAS, sendo as médias das variáveis dependentes em função dos níveis de inclusão de APA. Os consumos de energia bruta, digestível e metabolizável (Mcal/dia) apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,030$ ;  $P = 0,048$  e  $P = 0,035$ ) com os níveis de APA. Nosso estudo verificou redução linear ( $P = 0,033$ ) para tempo de ruminação e aumento linear ( $P = 0,015$ ) para o N-ureico no leite (g/dia), enquanto a produção de leite, produção corrigida para energia e para 3,5% de gordura apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,039$ ;  $P = 0,047$  e  $P = 0,020$ ) com a inclusão de APA, sendo os respectivos pontos de máxima de produção de leite nas concentrações de 8,4; 8,0 e 7,7 mg/kg MS, respectivamente. Os teores dos ácidos graxos do leite C16 total e C16:1c9+C17 anteiso apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,040$  e  $P = 0,046$ ) com maior teor observado no nível de APA 5 mg/kg. Entretanto, a dose de APA 5 mg/kg mostrou menor ( $P < 0,05$ ) rendimento de CH<sub>4</sub> (g/dia) por nutrientes ingeridos (kg/dia) e pelas suas frações digestíveis em comparação com as doses de APA 10 e 15 mg/kg. A dose de APA a 5 mg/kg de MS aumenta a produção de leite em aproximadamente 10% e apresenta potencial para reduzir o rendimento de metano.

Palavras-chave: consumo, desempenho, gases de efeito estufa, produção de leite, *Prosopis juliflora*

---

\*Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, DSc. UESB e Coorientadores: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, DSc. EMBRAPA e Fabiano Ferreira da Silva, DSc. UESB.



## ABSTRACT

COSTA, Diego Santana. **Levels of mesquite alkaloid extract in the diet of dairy cows.** Itapetinga, BA: UESB, 2022. 70p. Thesis. (PhD in Animal Science - Ruminant Production).\*

The purpose of this study was to evaluate the effects of enriched extract of mesquite piperidine alkaloids (APA) in the diet of lactating cows on intake, nutrient digestibility, milk production and composition, nitrogen and energy balance, rumen metabolism, milk fatty acids, gas exchange and enteric methane yield. The experimental diets consisted of: control diet without additive; with APA 5, 10 and 15 mg/kg of dry matter (DM). Four primiparous Holstein cows and four multiparous Girolando cows (3/4 Holstein x 1/4 Gyr) were housed in a *free stall*, with an average body weight of  $576,5 \pm 70$  kg, with an average daily milk production of  $20,7 \pm 2,2$  kg and a mean of  $132,8 \pm 25,7$  days in lactation. They were distributed in two balanced Latin squares (4 x 4), in an experimental period of 84 days, divided into 4 periods of 21 days, with 15 days of adaptation and 6 days for sample collection. The results were submitted to statistical analysis by the SAS, with the means of the dependent variables depending on the levels of APA inclusion. The consumption of gross, digestible and metabolizable energy (Mcal/day) showed quadratic variations ( $P = 0,030$ ;  $P = 0,048$  and  $P = 0,035$ ) with the APA levels. Our study found a linear reduction ( $P = 0,033$ ) for rumination time, and a linear increase ( $P = 0,015$ ) for N-urea in milk (g/day), while milk production, production corrected for energy and for 3,5% of fat showed quadratic variations ( $P = 0,039$ ;  $P = 0,047$  and  $P = 0,020$ ) with the inclusion of APA, with the respective points of maximum milk production at concentrations of 8,4; 8,0 and 7,7 mg/kg MS, respectively. The levels of fatty acids in total C16 and C16:1c9+C17 anteiso milk showed quadratic variations ( $P = 0,040$  and  $P = 0,046$ ) with the highest content observed at the APA level of 5 mg/kg. However, the APA 5 mg/kg dose showed lower ( $P < 0,05$ ) CH<sub>4</sub> yield (g/day) by ingested nutrients (kg/day) and by its digestible fractions compared to the APA 10 and 15 doses mg/kg. APA dose at 5 mg/kg DM increases milk yield by approximately 10% and has the potential to reduce methane yield.

Keywords: consumption, performance, greenhouse gases, milk production, *Prosopis juliflora*

---

\*Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, DSc. UESB e Co-adviser: Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, DSc. EMBRAPA e Fabiano Ferreira da Silva, DSc. UESB.

# I - REFERÊNCIAL TEÓRICO

## 1.1 - INTRODUÇÃO GERAL

Com aproximadamente 24 milhões de animais, o Brasil detém um expressivo rebanho leiteiro. Estima-se que 1,2 milhões de estabelecimentos produzem leite no território nacional, nos quais cerca de 16,4 milhões de vacas são ordenhadas, com produção média de 2.069 litros de leite vaca ano. Sendo que, em 2018, houve aumento de (1,6%) na produção de leite quando comparado ao ano anterior, alcançando 33,8 bilhões de litros. Sendo assim, o país está entre os quatro maiores produtores de leite do mundo (IBGE, 2019; EMBRAPA, 2019).

Segundo Martins et al. (2014), a cadeia leiteira exerce importância expressiva na composição do produto interno bruto (PIB) do país. Fato que é confirmado pela Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), uma vez que, o setor pecuário apresentou valor bruto da produção de R\$ 218,78 bilhões em 2018, dos quais a pecuária leiteira respondeu por R\$ 54,1 bilhões (CNA, 2019).

Entretanto, a produção de ruminantes apresenta sucessivos desafios em relação a: eficiência econômica, fornecimento de produtos que atendam padrões de qualidade, segurança alimentar e impacto ambiental. Nesse sentido, a indústria de alimentação animal investe crescentemente em pesquisas, bem como, no desenvolvimento de aditivos alimentares com o propósito de aprimorar o sistema produtivo do país e maximizar a eficiência produtiva dos ruminantes (Kebreab et al., 2010; Oliveira, 2005; O'mara, 2011).

A melhoria da eficiência bioeconômica e do impacto ambiental da indústria pecuária é promovida pelo uso de aditivos moduladores da fermentação ruminal, em que os ionóforos aumentam a eficiência alimentar em até 10% (Russell et al., 2003).

Os ionóforos poliéteres são lipossolúveis capazes de transportar cátions através das membranas celulares e atuam contra bactérias cuja membrana citoplasmática é exposta devido à menor espessura da parede celular e/ou à ausência da membrana externa. Assim, alteram a composição do microbioma core e decresce sua diversidade no rúmen (Schären et al., 2017).

Eles são utilizados como coccidiostáticos em aves e como promotores de crescimento em ruminantes. Monensina é um dos antibióticos mais utilizados na produção de gado de corte (Rutkowski & Brzezinski, 2013), e como um inibidor de protozoário e de bactérias gram-positivas no rúmen, pode contribuir para reduzir a produção gerada de hidrogênio e metano no rúmen (Choudhary et al., 2005; Domínguez; Guragain; Patrauchan, 2015; Efimova; Zakharova; Ostroumova, 2020).

O uso de ionóforos poliéteres foi proibido na União Européia desde 2006 para fins não terapêuticos, mas desde 2013, a monensina tem sido usada para prevenir a cetose em vacas leiteiras. Sua classificação como antibiótico e sua aplicação em longo prazo poderia resultar em um maior controle em anos futuros em outras regiões (Domínguez; Guragain; Patrauchan, 2015).

Entretanto, a demanda atual por produção com sustentabilidade e segurança alimentar, extratos de compostos naturais de plantas, bacteriocina e própolis têm sido pesquisados para modificar a fermentação ruminal com potencial antimetanogênico (Silva et al 2018; Vancek et al., 2006).

Neste contexto, surgiram os estudos *in vitro* e em pequenos ruminantes com o uso de diferentes níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de *Prosopis juliflora*, em que foram observados influência positiva na manipulação da fermentação ruminal, assim como, para eficiência microbiana e energética, além do potencial na redução de síntese de metano entérico (Brito et al., 2020; Oliveira et al., 2021; Pereira et al., 2017; Santos et al., 2013; Sousa et al., 2022).

Com base no exposto, objetivou-se avaliar o efeito de níveis do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de *Prosopis juliflora* como aditivo alimentar em dietas de vacas lactantes sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite, balanço de compostos nitrogenados, parâmetros ruminais, síntese de proteína microbiana, metabolismo energético e produção de metano entérico

## **1.2 USO DE ADITIVOS NATURAIS PARA RUMINANTES**

Os extratos vegetais possuem metabólitos secundários com diversidade nas estruturas químicas e atividades biológicas. De modo que, a maioria desses compostos apresentam atividade biológica sobre outros organismos vivos, seja nos processos metabólicos e/ou a taxa de crescimento de alguns microrganismos, além de compartilharem diversos benefícios e funções terapêuticas que os antibióticos oferecem.

Essas substâncias podem ser agrupadas em terpenos, fenóis e alcaloides (Bodas, et al., 2012; Blumenthal, 2003; Jouany & Morgavi, 2007; Oh et al., 2017; Pen et al., 2008; Salem, 2012).

Os alcaloides são substâncias orgânicas, cíclicas, de caráter básico, origem natural, praticamente restrito aos vegetais, apresenta atividade biológica, sua fórmula é composta basicamente de nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e carbono (Pelletier, 1983). Segundo Cozieret et al. (2006), cerca de 12.000 alcaloides já foram identificados, os quais são usados como fármacos, estimulantes, entorpecentes e venenos.

Segundo Choudary et al. (2005), os alcaloides possuem propriedades anfotéricas, resultantes dos anéis indólicos e heterocíclicos, que conferem o caráter polar e às longas cadeias de carbono, o caráter apolar. Esta característica de dupla polaridade pode promover um efeito desorganizador da membrana celular, alterando o transporte de íons e outras importantes substâncias, resultando em morte celular, quando em altas concentrações.

Assim sendo, em estudos realizados com alcaloides da espécie *Prosopis juliflora*, constataram semelhança com os ionóforos usados na nutrição de ruminantes (Brito, 2020; Santos et al., 2013). Uma vez que, as propriedades biocidas dos alcaloides, o mecanismo de ação ao aderirem na membrana celular das bactérias geram bloqueio dos canais de cálcio da membrana celular provocando assim atividade citotóxica (Choudary et al., 2005; Singh et al., 2011).

### **1.3 ALCALOIDES PIPERIDINICOS DE *PROSOPIS* NA DIETA DE RUMINANTES**

A espécie arbórea *Prosopis juliflora* (Sw). D.C, popularmente, conhecida como algaroba, pertence à família *Leguminosae* e subfamília *Mimosodae*, é uma planta xerófita, nessas foram identificadas 45 espécies do gênero *Prosopis*. Apresenta desenvolvimento em diversos tipos de ambientes, refletindo na sua distribuição nas regiões tropicais e subtropicais das Américas, África e Sudoeste da Ásia. A mesma foi introduzida no Nordeste do Brasil nos anos 40, como tecnologia alternativa de convivência com a seca (Azevedo, 1961; Gomes, 1961; Gibbons, 2005; Walter 2011). Em suma, a espécie é apontada como um dos 100 invasores biológicos mais dominantes do mundo (Becker et al., 2016; Walter & Armstrong 2014).

Verificam-se diferentes propósitos na utilização de cada parte da algarobeira, desde o uso como combustível, alimentação humana e animal (farinhas, pão, biscoitos, bolos e rações), remédios e cosméticos (Choge et al., 2007; Gusmão et al., 2016; Tiwari et al., 2013). Para alimentação, as vagens de *P. juliflora* são as partes mais exploradas (Patnaik; Abbasi; Abbasi, 2017).

As vagens detêm fração elevada de açúcar, cerca de 300 g/kg e 120 g/kg de proteína bruta na base de matéria seca. Por outro lado, as vagens de algaroba possuem fatores antinutricionais, como toxinas, polifenóis e alcaloides, que limitam o uso na alimentação animal, com recomendações de inclusão no máximo 20% na dieta de ruminantes (Ortega-Nieblas et al., 1996; Santos, 2013; Svensson et al., 2004). De maneira que, a ingestão em excesso de vagens de *P. juliflora* pode provocar distúrbios neurológicos, vulgarmente conhecido como “mal da cara torta”, além de outras consequências secundários (Silva et al., 2013).

Segundo Arunachalam et al. (2010), os extratos de *Prosopis juliflora* exercem atividade antibacteriana. Nesse sentido, Singh et al. (2011) ao estudarem os efeitos antibióticos de diversas partes da *Prosopis juliflora*, reportaram a presença de alcaloides de piridina em todas as frações pesquisadas. Estes mesmos autores relataram a presença de dois grupos de alcaloides, um com anel indolizidina no centro da molécula e outro sem anel. A juliprosopina, juliprosina e juliprosinina integram ao primeiro grupo de alcaloides, enquanto que, no segundo grupo estão a julifloridina, projulina e prosafrinina. Os autores supracitados, também, verificaram que a juliprosopina e a julifloridina apresentam maiores concentrações da fração ativa, apontando-os como principais responsáveis pela ação antibacteriana da vagem, folha e flor.

As piperidinas são compostos fitoquímicos pertencentes ao grupo dos alcaloides heterocíclicos, que têm marcante lipofilicidade e polaridade contribuindo para sua incorporação nas membranas celulares, e podem afetar muito o funcionamento de vários canais iônicos (Efimova et al., 2020), em particular juliprosopina com atividade de bloqueio dos canais  $Ca^{2+}$  (Brito et al., 2020). A ação de bloqueio do transporte de cálcio pode afetar tanto as bactérias gram-positivas, (Efimova et al., 2020), quanto as metanogênicas *Archaea* (Figueirêdo et al., 1995; Vancek et al., 2006).

A natureza qualitativa e quantitativa do perfil bioativo de alcaloides piperidínicos em *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C. (algaroba) pode variar significativamente devido à localização geográfica e à anualidade. Rhaman et al. (2011) encontraram variação no perfil de alcaloides bioativos em *Prosopis glandulosa* coletados em dois locais nos EUA,

Nevada em 2006 e Texas em 2008.

As análises de uma fração de alcaloides das vagens de algaroba coletadas em Senhor do Bonfim, estado da Bahia, Brasil, em setembro de 2013, levaram à identificação de três alcaloides: prosopina (316,27 g/mol), juliprosinina (626,54 g/mol) e juliprosopina (630,62 g/mol) (Lima et al., 2020).

Entretanto, o extrato básico clorofórmico (ECB) de vagens de algaroba de Brumado, Bahia, Brasil, coletadas em novembro de 2005 revelou a prosopina (627,5637 g/mol) como principal constituinte, que foi o primeiro reportado em vagens de *P. juliflora*. Enquanto a juliprosopina (630,5919 g/mol) e a juliprosinina (626,5608 g/mol) tiveram a menor concentração (Vancek et al., 2006). Esses alcaloides piperidínicos como bases terciárias no BCE de vagens de algaroba mostraram atividade contra bactérias gram-positivas e reduziram a produção de gás *in vitro* durante a fermentação ruminal sem afetar a degradabilidade da matéria seca do farelo de trigo (Vancek et al., 2006).

Juliprosina (628,5854 g/mol) como sal quaternário de folhas de *P. glandulosa* mostrou atividade contra fungos, plasmodium, bactérias gram-positivas, e apresentou ausência de toxicidade contra linhagem de células Vero® de mamíferos (Rhaman et al., 2011). Juliprosopina (630,5937 g/mol) como base terciária também mostrou atividade contra bactérias gram-positivas, mas, menos potente contra plasmodium e mostrou alta atividade contra linhagens de células de mamíferos (Rhaman et al., 2011).

Esses resultados indicam que os sais quaternários de alcaloides são melhores candidatos do que as bases terciárias para estudos adicionais com extrato de alcaloides piperidínicos como aditivo alimentar (Pereira et al., 2017).

Pereira et al. (2017) relataram que alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) em 0,13; 0,26; e 0,39 ppm não afetou a produção de N-amônia e não diferiu de monensina 0,11 ppm, durante 12 h e 24 h de fermentação *in vitro* de farelo de trigo com fluido ruminal. Entretanto, foi evidenciado que o APA 0,13 ppm aumentou a produção de propionato e a de acetato e lactato não diferiu em comparação com monensina 0,11 ppm. Com APA 0,26 ppm aumentou a produção de propionato, e as acetato e lactato não diferiram em relação a de monensina 0,11 ppm. APA 0,39 ppm aumentou a produção de lactato e manteve o acetato e o propionato em concentrações semelhantes a monensina 0,11 ppm.

Por outro lado, Silva et al. (2018) relataram que ensaios *in vitro* utilizando doses mais altas mostraram citotoxicidade induzida em diferentes linhagens celulares de mamíferos tratadas com extrato metanólico (3 ppm), fração alcaloide (3-300 ppm), ou

alcaloides isolados (30 ppm) como juliprosina (628,55 g/mol) e juliprosopina (630,54 g/mol) obtida de vagens de *P. juliflora* (Batatinha, 1997). Lima et al. (2020) mostraram que a fração rica em alcaloides de *P. juliflora* (juliprosinina, juliprosopina e prosopina) era mais bioativa do que o extrato metanólico. Isso sugere que a mistura de alcaloides no extrato enriquecido poderia potencializar seu efeito como aditivo alimentar.

Consistentemente, estudos realizados com doses menores de APA contendo juliprosinina, juliprosopina e prosopina mostraram aumento no desempenho de crescimento em cordeiros alimentados com dietas com doses variando de 2,3 a 31,5 mg/kg de MS, fornecendo concentrações intraruminais de aproximadamente 0,23 a 3,15 ppm por dia (Pereira & Silva, 2020). Além disso, os cordeiros não apresentaram nenhum sinal clínico de intoxicação e lesões histológicas descritas por Silva et al. (2020) e Figueirêdo et al. (1995), em ruminantes intoxicados com excesso de vagens de algaroba na dieta. Brito et al. (2020) compararam o uso de 31,5 mg/kg de matéria seca de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) e monensina em dietas com 13% e 16% de PB para ovinos e verificaram que o APA foi mais eficiente sobre o sincronismo da utilização da proteína e energia no rúmen. Uma vez que, animais que receberam o APA mantiveram o ganho de peso ainda que recebendo dietas com menores teores de PB, de maneira que, o autor recomenda a utilização do APA como aditivo alternativo.

#### **1.4 CALORIMETRIA INDIRETA – CONCEITOS E PRINCÍPIOS BÁSICOS**

A calorimetria fundamenta-se na mensuração da produção de calor, permitindo estimar direta ou indiretamente os gastos de energia pelo animal. Na calorimetria indireta, a qual é denominada, também, de respirometria, são mensuradas as trocas gasosas realizadas entre o organismo e ambiente. Através das quais, a quantificação do consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>), produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e metano (CH<sub>4</sub>), possibilita os cálculos das perdas energéticas através de gases e calor (Agnew; Yan, 2005; Borges et al., 2016; Diener, 1997).

Segundo Rodriguez et al. (2007), na respirometria em circuito aberto, o animal é alojado em uma câmara com sistema de vedação que impossibilita a troca gasosa entre o ar no interior da mesma e o ar externo, senão através do sistema de circulação de ar. Um fluxômetro de massa corrige o fluxo de ar em função da temperatura, pressão e umidade. As mensurações ocorrem durante 24 horas, o equipamento analisador (marca *Sable*) executa a leitura a cada cinco minutos, das concentrações de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, no ar

atmosférico e no ar que sai da câmara. De acordo Oliveira (2017), rotineiramente tem-se adotado os equipamentos de circuito aberto (câmaras respirométricas) nos estudos de metabolismo energético, bem como, na mensuração da produção de CH<sub>4</sub> em bovinos leiteiros.

## **1.5 EMISSÃO DE METANO ENTÉRICO POR RUMINANTES**

O metano (CH<sub>4</sub>) é um gás antropogênico, inodoro, incolor, pouco solúvel em água, compõe o grupo dos gases de efeito estufa (GEE), sendo a maior parte oriunda do setor agrícola. É considerado o segundo maior colaborador do aquecimento global, uma vez que, detém um potencial de aquecimento global 28 vezes maior que o dióxido de carbono (IPCC, 2013; Vieira et al., 2010).

CH<sub>4</sub> entérico é resultante do processo da digestão ruminal dos herbívoros ruminantes. Embora, a intensidade de emissão desse gás seja dependente de parâmetros como a categoria animal, ingestão e fração digestível do alimento (Berchielli; Messana; Canesin, 2012). Logo, a manipulação da fermentação ruminal com uso de aditivos na dieta possibilita a redução da emissão de CH<sub>4</sub>. Nesse sentido, uma alternativa seriam os produtos naturais a base de plantas utilizados para manipular a fermentação ruminal, devido as limitações de uso de aditivos alimentares antibióticos (Freitas et al., 2018; Mohammed et al., 2004; Shibata; Terada, 2010).

### **1.5.1 Formação de metano entérico no ecossistema ruminal**

Ao considerar a necessidade de um ambiente ruminal favorável para o crescimento dos microrganismos, a metanogênese é benéfica ao diminuir a concentração de hidrogênio, a qual é considerada como dreno de hidrogênio. Por outro lado, a síntese de CH<sub>4</sub> corresponde a perda de 11 a 13% da energia digestível (Johnson; Johnson, 1995; Mcdonald et al., 2002).

Segundo Van Soest (1994), o rúmen apresenta aspecto relevante, pois detém alta densidade e diversidade populacional de microrganismos capazes de sintetizar várias substâncias, como o CH<sub>4</sub>. Entretanto, esse gás não é metabolizado no organismo do animal, então grande parte é removida durante o processo de eructação que é fundamental para a manutenção do adequado balanço ruminal.



A fermentação ruminal é oxidativa, gera cofatores reduzidos (NADH, NADPH e FADH), os quais são reoxidados (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup> e FAD<sup>+</sup>) através de reações de desidrogenação, assim, o processo fermentativo não é paralisado. Embora, na desidrogenação seja liberado hidrogênio no rúmen, o qual é removido incessantemente pela metanogênese, que atua comoceptor de elétrons. Dessa forma, a síntese de CH<sub>4</sub> é fundamental para uma ótima performance do rúmen, evitando o excesso de H<sub>2</sub> no meio, o que causaria a inibição desidrogenase, envolvida na reoxidação dos cofatores reduzidos (Machado, 2011; Mcallister; Newbold, 2008).

O CH<sub>4</sub> é resultante da atividade das *Archaea* metanogênicas, grupo microbiano diferente das *Eukarya* (protozoários e fungos) e Bactérias. As espécies de *Archaeas* metanogênicas (*Methanobrevibacter ruminantium* e *Methanosarcina sp*) são predominantes no rúmen, as quais sintetizam CH<sub>4</sub>, basicamente, a partir da redução do CO<sub>2</sub>. Outra forma de produção de CH<sub>4</sub> pelas *Archaeas* é, por meio, do formato e, em menor grau, a partir do metanol, mono-, di- e tri-metilamina, além do acetato (Janssen; Kirs, 2008; Mcallister et al., 1996).

Além disso, durante a fermentação, sobretudo dos carboidratos fibrosos que geram acetato e butirato ocorre liberação de H<sub>2</sub>, que também, beneficia a metanogênese. Por outro lado, a formação de propionato é uma via competitiva no uso de H<sub>2</sub> no rúmen pela metanogênese. Logo, a síntese de CH<sub>4</sub> é influenciada pelas taxas de produção de acetato e propionato (Hegarty, 2001). A qual é resumida por Van Soest (1994).

- Glicose-----2 acetatos + 2 CO<sub>2</sub> + 8H<sup>+</sup>
- Glicose ----- 1 butirato + 2 CO<sub>2</sub> + 4H<sup>+</sup>
- Glicose + 4H<sup>+</sup>----- 2 propionatos + 2 H<sub>2</sub>O
- CO<sub>2</sub> + 8H<sup>+</sup>----- CH<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O

### 1.5.2 Uso de extrato alcaloídico de *prosopis juliflora* na mitigação de ch<sub>4</sub> entérico

Várias plantas possuem compostos secundários que as protegem do ataque de fungos, bactérias, insetos e herbívoros. Esses quando ingeridos pelos animais atuam como inibidores ou limitadores de alguns microrganismos ruminais, embora, o efeito dessas

substâncias sobre a metanogênese ruminal seja altamente variável (Busquet et al., 2006; Machado et al., 2011).

Metabólitos secundários de diversas plantas têm sido avaliados como possíveis mitigadores de metano entérico (Machado et al., 2011). Nesse sentido, inserem-se estudos realizados com de extratos alcaloídicos de *Prosopis juliflora* (algaroba) devido ao potencial de ação na fermentação ruminal.

Os alcaloides extraídos de algaroba podem mitigar produção de metano devido a perturbação das relações sintróficas entre comunidades microbianas (*Archeas* e bactérias fibrolíticas) que compartilham estruturas de parede celular de bactérias gram-positivas. Destarte, esses resultados validam a potencialidade do uso do extrato enriquecido de alcaloide da algaroba na manipulação da fermentação ruminal, cujo efeito redutor na produção de gases pode estar fortemente relacionado à mitigação na síntese de metano entérico (Moreira, 2014).

Em estudos *in vitro* realizados por Santos et al. (2013), também, com extrato clorofórmico básico da vagem de algaroba, reportaram a possibilidade de uso do extrato como aditivo na manipulação da fermentação ruminal, em substituição a monensina. Pois, promoveu a redução na produção de gases totais, elevou da proporção molar de propionato, sem efeitos negativos sobre o pH, síntese de biomassa microbiana e degradabilidade da matéria seca.

O extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos obtido como sais clorados (APA) de ECB foi utilizado na fermentação ruminal *in vitro* por Pereira et al. (2017). Foi observada menor produção de metano no período de 12 h de incubação com APA 0,26 ppm e farelo de trigo, e no período de 24 h com APA 0,39 ppm e feno de Tifton 85 em comparação com monensina 0,11 ppm. Além disso, a degradabilidade do farelo de trigo e do feno de capim Tifton 85 não foi afetada pelas doses de APA.

Em pesquisa de (Sousa, et al., 2022), com diferentes doses (6,6; 17,3 e 27,8 mg/kg MS) de extrato alcaloídico de algaroba como aditivo nutricional alternativo em substituição a monensina sódica para ovinos, verificaram o potencial na mitigação na produção de metano entérico. Pois, a produção de CH<sub>4</sub> (g/dia) foi semelhante para animais alimentados com dietas contendo extrato ou o aditivo convencional e reduziu com aumento das doses de inclusão do aditivo alternativo.

## 1.6 REFERÊNCIAS

AGNEW, R. E.; YAN, T. Calorimetry. **Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism**, 2.ed. France, 2005.

ALEM, M. RONQUILLO, L. CAMACHO, S. CERRILLO, I. DOMÍNGUEZ, J. BORQUEZ. Beneficial effects of plant extracts in ruminant nutrition: A review. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 82, p. 1117 – 1121, 2012.

ALVES JÚNIOR, R. T.; SOUZA, E. J. O. D.; MELO, A. A. S. D.; SILVA, D. A.; TORRES, T. R.; PERREIRA, G. F. C.; SILVA, J. R. C. D. Mesquite extract as phytogetic additive to improve the nutrition of sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, p. 164 - 174, 2017.

ARUNACHALAM, P.; SANKAR, M.; SUBRAMANIAN, B. Antibacterial activity of plant extract against plant bacterial pathogens. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 12, 167 - 170, 2010.

AZEVEDO, G. Algaroba. Rio de Janeiro, Serviço de Informação Agrícola (**SIA, 843**), 31 p. 1961.

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

BECKER, M.; ALVAREZ, M.; HELLER, G.; LEPARMARAI, P.; MAINA, D.; MALOMBE, I.; BOLLIG, M.; VEHR, H. Land-use changes and the invasion dynamics of shrubs in Baringo. **Journal of Eastern African Studies**, v.10, p. 111 - 129, 2016.

BERCHIELLI TT, PIRES AV, OLIVEIRA SG. **Nutrição de Ruminantes**. 2ed. Jaboticaba, SP: Universidade Estadual Paulista 616 p. 2011.

BERCHIELLI, T. T.; MESSANA, J. D.; CANESIN, R. C. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 954 - 968, 2012.

BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: Their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58. p. 1465 - 1483, 1984.

BLUMENTHAL M, HALL T, GOLDBERG A. **The ABC Clinical Guide To Herbs**. Austin, TX: American Botanical Council, 2003.

BODAS, RN, PRIETO, NR, GARCÍA GONZÁLEZ, RS, ANDRÉS, S, GIRÁLDEZ, FJ, LÓPES, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p. 78 - 93, 2012.

BORGES, A.L.C.C; SILVA, R.R.; FERREIRA, A.L.; LAGE, H.F.; VIVENZA, P.A.D.; CARVALHO, P.H.A.; FONSECA, M.P.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. Respirimetria e exigências nutricionais de zebuínos e cruzados de leite, em diferentes níveis de alimentação e estádios fisiológicos. In: VALADARES FILHO, S.C; COSTA E SILVA, L.F.; GIONBELLI, M.P.; ROTTA, P.P.; MARCONDES, M.I.; CHIZZOTTI, M.L.; PRADOS, L.F. Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados: BR-CORTE. 3ed. Viçosa: UFV, DZO. 2016. p. 163-190

BRITO, E. F.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, H. G. O.; SOARES, A. C. M.; CORREIA, G. S.; SOUSA, L. B.; SOUZA, L. B.; SOARES, V. P. S.; DE PAULA, V. F. Effects of enriched mesquite piperidine alkaloid extract in diets with reduced crude protein concentration on the rumen microbial efficiency and performance in lambs. **Czech Journal of Animal Science**, v. 65, p. 268 - 280, 2020.

BUSQUET M, CALSAMIGLIA S, FERRET A, KAMEL C. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 761 - 771, 2006.

CALSAMIGLIA S, BUSQUET M, CARDOZO PW, CASTILLEJOS L, FERRET A. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 2580 - 95, 2007.

CHOGE, S. K.; PASIECZNIK, N. M.; HARVEY, M.; WRIGHT, J.; AWAN, S. Z.; HARRIS, P. J. C. Prosopis pods as human food, with special reference to Kenya. **Water AS**, v. 33, p. 419 - 424, 2007.

CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; AZIM, M. K.; GHAYUR, M. N.; LODHI, M. A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B. M.; AHMAD, V. U. Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332 p. 1171 - 1179, 2005.

CNA - Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil – **Panorama do Agro** Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>>. Acesso: 25 de fev. 2020.

DE SOUZA, J.; PRÉ-SEAULT, C. L.; LOCK, A. L. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 172 - 185, 2018.

DIENER, J. R. C. Calorimetria indireta. **Revista da associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 245-53 1997.

DOMÍNGUEZ, D.C.; GURAGAIN, M.; PATRAUCHAN, M. Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. **Cell Calcium**, v.57, p.151-165, 2015.

EFIMOVA, S.S.; ZAKHAROVA, A.A.; OSTROUMOVA, O.S. Alkaloids modulate the functioning of ion channels produced by antimicrobial agents via an influence on the lipid host. **Front Cell Dev Biol.** v. 8, p.537, 2020.

EMBRAPA – **Anuário leite 2019.** Disponível em: <file:///C:/Users/Diego%20Santana/Downloads/Anuario-LEITE-2019%20(4).pdf>. Acesso: 10 de jan. 2020.

FIGUEIRÊDO, L.J.C.; TÁVORA, J.P.F.; FERREIRA, M.M.; SIMÕES, S.V.D.; DANTAS, J. Estudo clínico e anatomopatológico da doença “cara torta” em bovinos no Nordeste Brasileiro. **Arq Esc Med Vet, UFBA** v.18, p.175-183, 1995.

FREITAS, D. S.; TERRY, S. A.; RIBEIRO, R. S.; PEREIRA, L. G. R.; TOMICH, T. R.; MACHADO, F. S.; CAMPOS, M. M.; CORRÊA, P. S.; ABDALLA, A. L.; MAURÍCIO, R. M.; CHAVES, A. V. Chaves2Unconventional Vegetable Oils for a Reduction of Methanogenesis and Modulation of Ruminal Fermentation. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 5, p. 1 - 9, 2018.

GIBBONS, S. Plants as a source of bacterial resistance modulators and anti-infective agents. *Phytochem.* **Phytochemistry Reviewa**, v. 4, p. 63 - 78, 2005.

GOMES, P. A algarobeira. Rio de Janeiro, **Serviço de Informação Agrícola**, 1961. 49p. (SIA, 865).

GUSMÃO, R. P.; CAVALCANTI-MATA, M. E. R. M.; DUARTE, M. E. M.; GUSMÃO, T. A. S. Particle size, morphological, rheological, physicochemical characterization and designation of minerals in mesquite flour (*Prosopis juliflora*). **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 119 - 124, 2016.

HEGARTY, R. Greenhouse gas emissions from the Australian livestock sector what do we know, what can we do? Canberra: **NSW Agriculture Australian Greenhouse Office**, 2001. 35 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal 2018.** Disponível em: <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2018\\_v46\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2018_v46_br_informativo.pdf)>. Acesso: 20 de fev. 2020.

IPCC - INTERGOVERNAMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** Disponível em:

<[http://www.climatechange2013.org/images/report/WG1AR5\\_ALL\\_FINAL.pdf](http://www.climatechange2013.org/images/report/WG1AR5_ALL_FINAL.pdf)>.  
Acesso: 13 de fev. 2020.

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

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2483 - 2492, 1995.

JOUANY, JP, MORGAVI, D. Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. **The Animal Consortium**, v. 1, p.1443 - 1466, 2007.

JOUE - JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPÉIA. **Regulamento (CE) nº 1831/2003** do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia de 22 de setembro de 2003. Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal.

KEBREAB, E.; STRATHE, A.; FADEL, J.; MORAES, L.; FRANCE, J. Impact of dietary manipulation on nutrient flows and greenhouse gas emissions in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.458 - 464, 2010 (supl. especial).

LIMA, H.G.D.; SANTOS, F.O.; SANTOS, A.C.V.; SILVA, G.D.D.; SANTOS, R.J.D.; CARNEIRO, K.D.O.; ...BOTURA, M.B. Anti-tick effect and cholinesterase inhibition caused by *Prosopis juliflora* alkaloids: in vitro and in silico studies. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, p. 019819, 2020.

MACHADO, F. S.; PEREIRA, L. G. R.; GUIMARAES JR., R.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C.; CHAVES, A.V.; CAMPOS, M. M.; MORENZ, M. J. F.; Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação. **Embrapa Gado de Leite Documentos**, 147. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 92p, 2011.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, Anexo III - **IN 2018** Aditivos - inclui DMPP 31-10-19.pdf. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/alimentacao-animal/aditivos>>. Acesso em 20 de jan. 2020.

MARTINS, H. C.; MUYLDER, C. F.; LOPES, C. A.; FALCE, J. Os impactos da difusão tecnológica na bovinocultura leiteira: um estudo dos integrantes da cadeia agroindustrial do leite em um município em Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 1141-1146, 2014.

MATOS, B. C. Uso de aditivos na pecuária leiteira: revisão. **PUBVET**, v. 2, p. 159 -164, 2008.

McALLISTER, A. T.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; CHENG, K. J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, v.76, p. 231 - 243, 1996.

MCALLISTER, T.A.; NEWBOLD, C.J. Redirecting rumen methane to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 48, p. 7-13, 2008.

McDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A. **Animal Nutrition**. 6.ed. Pearson Education Limited. Harlow. Essex, UK. p.266 - 277, 2002.

MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H.; LILA, Z.A. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on *in vitro* tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Animal Feed Science and Technology**, v.116, p.301 - 311, 2004

MOREIRA, J. V. Efeitos de extratos alcoólicos de vagem de algaroba sobre os produtos de fermentação ruminal *in vitro*. 2014. 64p. **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, BA, 2014.

MOURÃO, R. D. C et al. Aditivos alimentares para vacas leiteiras. **Revista Eletrônica Nutritime**, Art. 179, v. 9, n. 5, p. 2011–2040. Setembro/Outubro, 2012.

O'MARA, F.P. The significance of livestock as a contributor to global greenhouse gas emissions today and in the near future. **Animal Feed Science Technology**, v.166, p.7–15, 2011.

OH J.; WALL E. H.; BRAVO, D. M.; HRISTOV, A. N. Phytonutrients as additives in ruminants: the unexpected target organ. **Journal of Animal Science**, v. 94, p. 496 - 497, 2017.

OLIVEIRA JS, ZANINE AM, SANTOS EM. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.6, p.1 - 23, 2005

OLIVEIRA, A. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H. G. O.; SILVA, E. R.; DUTRA, I. C.; CORREIA, G. S.; SOARES, V. P. S.; OLIVEIRA, K. P.; PORTO, M. R. Enriched Mesquite Piperidine Alkaloid Extract Improves the Performance in Growing Goats. **International Journal of Environmental and Agriculture Research**, v. 7, p. 77-90, 2021.

OLIVEIRA, B. C.; CAETANO, G. A. O.; CAETANO JÚNIOR, M. B.; MARTINS, T. R.; OLIVEIRA, C. B. Mecanismos reguladores de consumo em bovinos de corte: Fatores físicos, fatores químicos, fatores psicogênicos, ingestão de água. **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, MG, v. 14, p. 6066 - 6075, 2017.

ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; ROBLESBURGUEÑO, M.R. Protein quality and antinutritional factors of wild legume seeds from the sonoran desert. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3130 - 3132, 1996.

PATNAIK, P.; ABBASI, T.; ABBASI, S. A. Prosopis (Prosopis juliflora): blessing and bane. **Tropical Ecology**, v. 58, p. 455 - 483, 2017.

PELLETIER, S.W. ed. (1983-1988) Alkaloids Chemical and Biological Perspectives, Vol 1-6, New York, USA, Willey.

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, 193 - 1999, 2008.

PEREIRA, T. C. J.; PEREIRA, M. L. A.; MOREIRA, J. V.; AZEVÊDO, J.A.G.; BATISTA, R.; DE PAULA, V. F.; OLIVEIRA, B. S.; SANTOS, E. J. Effects of alkaloid extracts of mesquite pod on the products of *in vitro* rumen fermentation. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, p. 4301 - 4311, 2017.

RAHMAN, A.A.; SAMOYLENKO, V.; JACOB, M.R.; SAHU, R.; JAIN, S.K.; KHAN, S.I.; TEKWANI, B.L.; MUHAMMAD, I. Antiparasitic and antimicrobial indolizidines from the leaves of *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*. *Planta Med.* v.77, p. 1639 – 1643, 2011.

RODRIGUEZ, N. M.; CAMPOS, W. E. Manipulação ruminal para redução da emissão de metano. In: Simpósio Nacional sobre Produção Animal e Ambiente, 1, 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. p. 1-28.

RODRÍGUEZ, N.M; CAMPOS, W.E.; LACHICA, M.L. BORGES, I.; GONÇALVES, L.C.; BORGES, A.L.C.C.; SALIBA, E.O.S. A calorimetry system for metabolismo trials. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 495 - 500, 2007.

RUFINO JUNIOR, J; CARVALHO, D.M.G; SOUZA, J.G.; CABRAL, L.S.; SILVA, J.J.; RIBEIRO, M.D.; ARNOLDO, T.L.Q.; OLIVEIRA, A.S.; SOARES, J.Q. Caróço de algodão em dietas sem volumoso para cordeiros confinados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, p. 2727 - 2738, 2015.

RUSSELL J.B; HOULIHAN A.J, Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiol Ver.** v. 27, p. 65 – 74, 2003.

RUTKOWSKI, J.; BRZEZINSKI, B. Structures and properties of naturally occurring polyether antibiotics. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SANTOS, E. T.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, C. F. P. G.; SOUZA-NETA, L. C.; GERIS, R.; MARTINS, D.; SANTANA, A. E. G.; BOABOSA, L. C. A.; SILVA, H. G. O.;



FREITAS, G. C.; FIGUEIREDO, M. P.; OLIVEIRA, F. F.; BATISTA, R. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 8496 - 8516, 2013.

SANTOS, J. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H.G.O.; SANTOS, O. O.; CARVALHO, G. G. P.; ALMEIDA, J. R. F. A.; SILVA, R. P.; RIBAS, K. P. O. Supplementation with mesquite alkaloids extract in diets for lambs fed Bermuda grass improves growth performance. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106 - 560, 2021.

SCHÄREN, M.; DRONG, C.; KIRI, K.; RIEDE, S.; GARDENER, M; MEYER, U.; HUMMEL, J.; URICH, T.; BREVES, G.; DÄNICKE, S. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**. v.100 p. 2765 – 2783, 2017.

SHIBATA, M.; TERADA, F. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. **Animal Science Journal**, v.81, p.2–10, 2010.

SILVA, C. S.; SOUZA, E. J. O.; SANTANA, A. L. B. D.; PEREIRA, G. F. C. DIGESTIBILIDADE DE NUTRIENTES EM OVINOS SUBMETIDOS À INGESTÃO DE ADITIVOS FITOGÊNICOS. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – **JEPEX 2013** – UFRPE: Recife, 09 a 13 de dezembro de 2013.

SILVA, L.F.; GIONBELLI, M.P.; ROTTA, P.P.; MARCONDES, M.I; CHIZZOTTI, M.L.; PRADOS, L.F. Exigências Nutricionais de Zebuínos Puros e Cruzados: **BR-CORTE**. 3ed. Viçosa: UFV, DZO. p. 163-190, 2016.

SILVA, V.; SILVA. A.M.M.; SILVA, J.; COSTA, S. Neurotoxicity of *Prosopis juliflora*: from Natural Poisoning to Mechanism of Action of Its Piperidine Alkaloids. **Neurotox Res**. v. 34, p. 878-888, 2018.

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

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

SOUSA, L. B.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, H. G. O.; SOUSA, L. B.; SILVA, L. S.; MACHADO, F. S.; TOMICH, T. R.; OSS, D. B.; FERREIRA, A. L. CAMPOS, M. M.; COSTA, I. C.; PEREIRA, L. G. R. *Prosopis juliflora* piperidine alkaloid extract levels in diet for sheep change energy and nitrogen metabolism and affect enteric methane yield. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022.

SOUZA, J. M. et al. Aditivos zootécnicos e a manipulação da fermentação ruminal. In.: BALIEIRO, J. C. C. et al. *Novos Desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal*, 2018. Cap. IV.

SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C. Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1696, p.1451 - 56, 2004.

TIWARI, B. P., R. R. BHUSHAN, G. A. NAYAN & P. P. SUNIL. An overview: Sustained release drug delivery technologies with polymeric system. **Pharmascience Monitor-an International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.4, p. 3506 - 3521, 2013.

VAN SOEST, P. J. **Nutrition ecology of ruminants**. Ithaca. Cornell University Press, p. 476, 1994.

VANCEK M, VIDOVÁ M, MAJERNÍK AI AND SMIGÁN P. Methanogenesis is  $\text{Ca}^{2+}$ dependent in *Methanothermobacter thermautotrophicus* strain  $\Delta\text{H}$ . **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, p. 269 - 273, 2006.

VIEIRA, S.S.; ZOTTI, C.A.; PAULINO, V.T. Práticas de manejo para minimizar a emissão de gases do efeito estufa associadas ou não ao uso de fertilizantes. Curso de Pós-graduação em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, 45p., 2010.

WALTER, K. **Prosopis, an Alien among the Sacred Trees of South India. 2011, 2006p.** Doctoral dissertation (monograph), University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Forest Sciences, 2011.

WALTER, K. J.; K. V. ARMSTRONG. Benefits, threats and potential of *Prosopis* in South India. *Forests, Trees and Livelihoods*, v. 23: 232 - 247, 2014.

## **II – OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos de níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperídnicos de algaroba (APA) para vacas lactantes.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar os efeitos de APA sobre:

O consumo e a digestibilidade dos nutrientes;

A produção e composição do leite;

O balanço de nitrogênio e de energia;

Os parâmetros de fermentação ruminal (pH, ácidos graxos de cadeia curta e nitrogênio amoniacal) e síntese de proteína microbiana;

O perfil dos ácidos graxos do leite;

A produtividade de metano entérico.

### III - CAPÍTULO I

#### **Níveis de extrato alcaloídico de algaroba em dieta com caroço de algodão afetam metabolismo de energia e respostas de produção em vacas lactantes**

##### **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) em dieta de vacas lactantes sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite, balanço de nitrogênio e de energia. As dietas experimentais consistiram em: dieta controle sem aditivo; com APA 5, 10 e 15 mg/kg de matéria seca (MS). Foram utilizadas quatro vacas primíparas da raça Holandês e quatro múltiparas Girolando (3/4 Holandês x 1/4 Gir), alojadas em galpão *free stall*, com peso corporal médio de  $576,5 \pm 70$  kg, com produção de leite média diária de  $20,7 \pm 2,2$  kg e média de  $132,8 \pm 25,7$  dias em lactação. Foram distribuídas em dois quadrados latinos balanceados (4 x 4), em um período experimental de 84 dias, divididos em 4 períodos de 21 dias, com 15 dias de adaptação e 6 para coleta de amostras. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo SAS, sendo as médias das variáveis dependentes em função dos níveis de inclusão de APA. Os níveis de APA não afetaram ( $P > 0,05$ ) o consumo e digestibilidade da matéria seca (MS) e nutrientes. O consumo de energia bruta, digestível e metabolizável (Mcal/dia) apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,030$ ;  $P = 0,048$  e  $P = 0,035$ ) com os níveis de APA, sendo os pontos máximos de consumo nas concentrações de 6,4; 6,3 e 6,1 mg/kg do aditivo, respectivamente. Houve redução linear ( $P = 0,033$ ) para tempo de ruminação, aumento ( $P = 0,015$ ) da secreção de N-ureico no leite ( $P = 0,015$ ) e na urina não foi afetado ( $P > 0,05$ ), enquanto a produção de leite e produção corrigida para energia apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,039$  e  $P = 0,047$ ) com a inclusão de APA, sendo os respectivos pontos de máxima estimados nas concentrações de APA em 8,4 e 8,0 mg/kg. O consumo de energia metabolizável e a produção de leite são maiores quando APA é adicionado a 5 mg/kg MS da ração e a dose de APA 5 mg/kg, não reduz o o tempo gasto com ruminação e não altera a perda de energia bruta como metano.

Palavras-chave: consumo, desempenho, produção de leite, *Prosopis juliflora*

## ABSTRACT

This work aimed to evaluate the effects of enriched extract levels of mesquite piperidine alkaloids (APA) in the diet of lactating cows on intake, nutrient digestibility, milk production and composition, nitrogen and energy balance. The experimental diets consisted of: control diet without additive; with APA 5, 10 and 15 mg/kg of dry matter (DM). Four primiparous Holstein cows and four multiparous Girolando cows (3/4 Holstein x 1/4 Gyr) were housed in a free stall, with an average body weight of  $576,5 \pm 70$  kg, with an average daily milk production of  $20,7 \pm 2,2$  kg and a mean of  $132,8 \pm 25,7$  days in lactation. They were distributed in two balanced Latin squares (4 x 4), in an experimental period of 84 days, divided into 4 periods of 21 days, with 15 days of adaptation and 6 days for sample collection. The results were submitted to statistical analysis by the SAS, with the means of the dependent variables depending on the levels of APA inclusion. APA levels did not affect ( $P > 0,05$ ) dry matter (DM) and nutrients intake and digestibility. The consumption of gross, digestible and metabolizable energy (Mcal/day) showed quadratic variations ( $P = 0,030$ ;  $P = 0,048$  and  $P = 0,035$ ) with the APA levels, with the maximum points of consumption at concentrations of 6,4; 6,3 and 6,1 mg/kg of the additive, respectively. There was a linear reduction ( $P = 0,033$ ) for rumination time, increase ( $P = 0,015$ ) of urea-N secretion in milk ( $P = 0,015$ ) and in urine was not affected ( $P > 0,05$ ), while the production of milk and production corrected for energy showed quadratic variations ( $P = 0,039$  and  $P = 0,047$ ) with the inclusion of APA, with the respective maximum points estimated at APA concentrations at 8,4 and 8,0 mg/kg. The consumption of metabolizable energy and milk production are higher when APA is added to 5 mg/kg DM of the ration and the APA dose of 5 mg/kg, does not reduce the time spent on rumination and does not change the loss of gross energy as methane.

Keywords: consumption, performance, milk production, *Prosopis juliflora*

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite está em constante processo de intensificação, desafiada a maximizar a produtividade dos animais, bem como, adequar-se às exigências contemporâneas do mercado consumidor. Os ionóforos poliéteres, antibióticos comumente utilizados como promotores de crescimento para bovinos de corte, apresentam restrições de aplicação mais ampla devido ao potencial tóxico e presença nos produtos animais e no meio ambiente (Regulamentação, 1831/2003/EC).

Apesar de ionóforos serem banidos para uso em ruminantes desde 2006 na Europa, em 2013 a Agência de Medicina aprovou o uso de monensina em cápsula de liberação lenta para controlar cetose em vacas no período de transição. Nas últimas décadas, pesquisadores têm publicado estudos sobre os efeitos de monensina sobre produção, saúde e fermentação ruminal em vacas leiteiras. Sobretudo, a maioria dos estudos mostrou ausência de impacto na produção e composição do leite e no balanço de nitrogênio (Mammi et al., 2021).

No entanto, a comunidade científica engajada nos princípios de sustentabilidade de sistemas produtivos em longo prazo e segurança alimentar, tem buscado identificar compostos fitogênicos que atuem como modulares da fermentação ruminal para aumentar a eficiência alimentar e produtividade em ruminantes. Além disso, a literatura mostra que os efeitos destes compostos no ambiente ruminal são dependentes da dosagem, perfil e ingredientes que compõem as dietas.

O farelo de vagem integral de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw). D.C.) como substituto ao milho em dietas de vacas lactantes é possível devido à similaridade no conteúdo de carboidratos não fibrosos (53,4%) e de proteína bruta (9,3%), apesar de os componentes da fração de carboidratos diferirem (Valadares Filho et al., 2015). No entanto, a quantidade de farelo integral de vagens de algaroba em dietas para vacas lactantes não deve exceder 30% devido à presença de alcaloides tóxicos (Talpada & Shukla, 1988).

Por outro lado, estudos *in vitro* e também com pequenos ruminantes submetidos a dietas suplementadas com diferentes doses (2,3 a 31,5 mg/kg de matéria seca) de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos (majoritariamente composto por juliprosinina e juliprosopina) extraídos de vagem de *P. juliflora*, mostraram efeitos

de aumento na proporção molar de propionato, redução de metano e aumento da síntese de proteína microbiana no rúmen, assim como, melhoria da utilização de proteína e energia da dieta e aumento de ganho de peso (Oliveira et al., 2021; Brito et al., 2020; Pereira et al., 2017; Santos et al., 2013; Santos et al. 2021). Adicionalmente, Brito et al. (2020) evidenciaram que o extrato de alcaloides de algaroba na dose de 31,5 mg/kg não é tóxico em avaliação clínica e histopatológica em ovinos.

Dentre os principais efeitos relatados tem-se o aproveitamento energético e proteico, pois os cordeiros não reduziram a taxa de ganho de peso quando receberam dietas com menor aporte proteico suplementadas com 31,5 mg de APA por kg de matéria seca (Brito et al., 2020). Portanto, devido ao seu potencial de escala e resultados promissores com pequenos ruminantes, torna-se importante o estudo com o propósito de avaliação de parâmetros supracitados e conseqüentemente o estabelecimento de dosagens seguras para vacas lactantes.

É importante ressaltar que, as respostas ao uso dos metabólitos secundários de plantas variam conforme a dieta em que são adicionados (Patra & Saxena, 2009). Nesse sentido, o caroço de algodão, uma das alternativas na composição das dietas para vacas lactantes, sobretudo pelo maior conteúdo de energia e de proteína degradável e efetividade da fibra, igualmente, afeta a atividade microbiana no rúmen (NRC, 2001), podendo associar-se aos efeitos de aditivos.

Nessa pesquisa, objetivou-se avaliar o efeito da utilização de níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (*Prosopis juliflora*) (APA) como aditivo alimentar em dieta contendo caroço de algodão para vacas lactantes sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite, partição de nitrogênio e de energia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos adotados com os animais nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil; Protocolo CEUA-EGL 9817210818).

### 2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal

As vagens maduras de *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C. foram obtidas no município de Brumado, Itapetinga e Manoel Vitorino, no estado da Bahia, entre os meses de janeiro e março de 2018. Estas foram colhidas manualmente após caírem no chão, selecionadas apenas as que não apresentavam alterações visíveis no pericarpo e armazenadas.

Em uma lona plástica as vagens foram expostas ao sol e revolvidas diversas vezes, durante 5 dias para perda de umidade antes do início do processamento. As vagens foram trituradas em triturador estacionário tipo Willey, no Laboratório de Forragicultura da UESB, onde posteriormente foram processadas em desintegrador de facas com utilização de peneira de 2 mm (Nogueira DPM 2), obtendo-se a farinha integral, que foi embalada em sacos de polietileno e acondicionada em freezer a - 20°C para conservação.

## **2.2 Obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba**

No Laboratório de Fisiologia Animal da UESB, a farinha integral de algaroba, foi macerada com etanol 99%, durante 72 h, posteriormente essa solução foi percolada e armazenada em recipientes fechados. Após a percolação, em evaporador rotatório a solução extraída foi concentrada a vácuo (-600 mmHg), em temperatura controlada de 40°C, obtendo-se assim o extrato etanólico bruto (EEB).

No processamento do EEB utilizaram-se soluções ácido-básicas e solventes orgânicos para obtenção dos extratos enriquecidos com alcaloides, seguindo a metodologia de Ott-Longoni et al. (1980) e para isolar os alcaloides piperidínicos de farinha integral de algaroba de acordo (INPI, 2014; SANTOS et al., 2013).

Solubilizou-se parte do EEB (100 g) em solução aquosa de ácido acético 1,6 M (AcOH, 200 ml), a solução resultante foi filtrada obtendo-se a solução aquosa ácida I (SAA-I). A SAA-I foi fracionada com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), em duas lavagens sucessivas de 150 ml, obtendo-se a solução aquosa ácida II (SAA II). A SAA II foi alcalinizada com hidróxido de sódio (NaOH) até atingir pH 9,0, passando a ser denominada de solução aquosa básica I (SAB I).

A SAB I passou por tripla lavagem com 100 ml de CHCl<sub>3</sub>, obtendo-se a solução aquosa básica II (SAB II). Esta foi submetida à dupla lavagem com solução de cloreto de sódio 10% (NaCl), resultando na solução aquosa básica III (SAB III) que posteriormente foi desidratada com 5 g de sulfato de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), homogeneizada e deixada em repouso durante 2 horas. Após filtração, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo e no evaporador rotativo a 57°C o clorofórmio foi evaporado, obtendo-se o extrato clorofórmico básico (ECB).

Para a quantificação do rendimento de obtenção do ECB a partir do EEB, foi considerada a quantidade de 1150 g de EEB obtendo-se em torno de 17 g ECB seco, cujo rendimento de extração equivalente a 1,5%. A identificação dos principais alcaloides



(Tabela 1) foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Shimadzu) e espectrometria de massas (Espectrômetro Amazon Speed ETD – Bruker).

Tabela 1. Alcaloides piperidínicos identificados a partir de ECB de vagens de *Prosopis juliflora*.

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Ocorrência relativa <sup>a</sup>
Juliprosinina	C <sub>40</sub> H <sub>72</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	626,49	+++
Juliprosopina	C <sub>40</sub> H <sub>76</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	630,48	++
Prosopina	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>3</sub>	316,26	+

<sup>a</sup> Área relativa do pico no cromatograma; ECB - extrato clorofórmico básico.

Para preparo do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA), utilizou-se uma balança analítica e separadamente em erlenmeyer o ECB foi pesado e solubilizado com clorofórmio, transferido para funil de decantação para lavagem com HCl 10% e obtenção da subfração aquosa ácida (APA), que foi pulverizada na mistura mineral das dietas experimentais e armazenada para fornecimento na hora da oferta aos animais.

### 2.3 Animais, dietas e delineamento experimental

As avaliações de desempenho e estimativas de produção de gases em vacas lactantes ocorreram no Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, do Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da EMBRAPA Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil (latitude: 21° 35' 16" S; longitude: 43°, 15' 46" W; altitude: 484 m) no período de fevereiro a maio de 2019.

Foram utilizadas quatro vacas primíparas da raça Holandesa e quatro múltiparas Girolando (3/4 Holandesa x 1/4 Gir), com peso corporal médio de 576,5 ± 70 kg, com produção de leite diária média de 20,7 ± 2,2 kg e média de 132,8 ± 25,7 dias em lactação. As vacas foram distribuídas em dois quadrados latinos balanceados (4 x 4), em um período experimental de 84 dias, divididos em 4 períodos de 21 dias, com 15 dias de adaptação e 6 dias para coleta de dados.

As dietas experimentais variaram em níveis de APA: dieta padrão sem aditivo (0) e com adição de APA 5, 10 e 15 mg/kg MS. As dietas foram formuladas com base nas recomendações do NRC (2001), para atender manutenção e produção média de 20 kg de leite por dia. As dietas foram compostas por concentrado (milho moído, farelo de soja,

caroço de algodão, mistura mineral) e silagem de milho na respectiva proporção de 41,4 e 58,6, sendo a proporção expressa na base da MS (Tabela 2).

Tabela 2 – Composição da ração mista total (RMT).

Ingrediente	Matéria seca (g/kg MN)	RMT (g/kg MS)
Silagem de milho	310,81	585
Farelo de soja	887,8	111
Caroço de algodão	909,4	115
Milho moído	878,4	107
Mistura mineral <sup>a</sup>	928,2	82
<b>Nutriente</b>		
Matéria orgânica		921,4
Proteína bruta		160,0
Extrato etéreo		58,5
Matéria mineral		78,6
Fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína		305,3
Fibra em detergente ácido		239,5
Carboidratos não fibrosos		463,4
Carboidratos totais		702,9
Energia bruta (Mcal/kg)		4,42

<sup>a</sup>Mistura mineral para vacas leiteiras - Composição (mínimo): Ca: 190 g/kg; P: 60 g/kg; Na: 70 g/kg; Mg: 20 g/kg; Co: 15 mg/kg; Cu: 700 mg/kg; Mn: 1.600 mg/kg; Se: 19 mg/kg; Zn: 2.500 mg/kg e I: 40 mg/kg.

As vacas foram alojadas em galpão *free stall*, as camas com piso de borracha (WINGFLEX, Kraiburg, Tittmoning, Alemanha) forrado com maravalha, a qual era substituída diariamente e a limpeza de pista foi realizada por scraper (ACD 70-100-120c-180, DeLaval Ltd., Hamilton, 3241, New Zealand) conforme a necessidade diária.

O galpão era climatizado com ventiladores, aspersores, provido de sistema eletrônico de monitoramento de ingestão individual de alimento e número das visitas aos cochos (AF-1000 Master Gate, Intergado Ltda., Contagem, MG, Brasil), bebedouro coletivo com capacidade de 45 L de água e balança para pesagem corporal automática (WD-1000, Intergado Ltda., Contagem, MG).

Cada animal recebeu na orelha direita um transponder passivo (FDX - ISO 11784/11785, Allflex, Joinville, SC, Brasil), para identificação eletrônica e abertura do portão do respectivo cocho.

Para monitoramento de ruminação utilizou-se um colar Hr -Tag (SCR Engineers LTD., Netanya, Israel,), com longger posicionado no lado esquerdo do pescoço e os dados foram registrados em intervalos de 2 h (Schirrmann et al., 2009).

O acesso à água e dietas foi *ad libitum*, o fornecimento das dietas na forma de ração mista total ocorria nos horários após ordenha 8h30 (60%) e 15h30 (40%) com controle da quantidade ofertada para assegurar sobras de 5 a 10%.

## 2.4 Consumo e digestibilidade

Após o período de adaptação às dietas de 15 dias, do 16º ao 21º dia de cada período experimental foram amostrados os ingredientes das dietas fornecidas e sobras de cada animal para determinar o consumo de nutrientes. As amostras fecais foram coletadas diretamente do reto dos animais de acordo com a distribuição: 16º dia às 8h00 e 14h00; 17º dia às 10h00 e 16h00; e 18º dia às 12h00 e 18h00. Todo material amostrado fresco (300 a 500 g) foi colocado em sacos plásticos, identificados e armazenados a - 20°C.

O consumo de MS foi determinado pela subtração da quantidade de MS de concentrado e silagem de milho fornecida e a MS das sobras, enquanto o consumo de nutrientes foi obtido pela determinação das concentrações de nutrientes do concentrado e silagem de milho e sobras e calculado conforme a fórmula:

**Consumo de nutrientes** = (kg MS do volumoso e concentrado fornecidos x % nutrientes) – (kg MS da sobra x % nutrientes)

Para estimativas dos coeficientes de digestibilidade aparente total foi utilizado o indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi), conforme Detmann et al. (2012). Para determinação da concentração de FDNi foi usada aproximadamente 1 g de cada amostra composta dos ingredientes componentes das dietas, sobras e fezes em sacos F57 (Ankon®) para incubação *in situ*. Estes foram selados, colocados em sacos de náilon e incubados em bovino fistulado no rúmen, sendo alimentado com silagem de milho e concentrado. Após 288 h de incubação os saquinhos foram retirados do rúmen e lavados com água corrente. Em seguida levados à estufa de circulação forçada de ar por 48 h. Para determinação do resíduo utilizou-se o aparelho ANKON de acordo com INCT-CA (2012).

**Produção fecal:**  $PF = DI / IF$

**PF**= produção de matéria seca de fezes (g)

**DI**= dose ingerida do indicador (g)

**IF**= concentração do indicador nas fezes (g/g)

O coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes foi calculado em percentual, subtraindo-se a quantidade excretada nas fezes da quantidade consumida, na base da matéria seca fecal de cada animal por período de coleta de fezes, seguindo a metodologia de Silva & Leão (1979).

A digestibilidade dos nutrientes (DN) foi obtida pela seguinte fórmula:

$[DN = (IMS \times \% \text{ Nutriente}) - (MS \text{ excretada} \times \% \text{ Nutriente}) \times 100] / (IMS \times \% \text{ Nutriente})$

## 2.5 Desempenho de produção

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (7:30 h e 15:30 h) em ordenhadeira mecanizada (DeLaval, Tumba, Suécia), tipo espinha de peixe (2x4) de circuito fechado com linha baixa equipada com medidores de leite eletrônicos MM27, controles MPC 580/680 e removedor automático de coletores (ACR). Os dados de produção de leite foram obtidos pelo software Alpro (DeLaval, Tumba, Suécia). A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (LCG -3.5%) conforme o modelo proposto por (Sklan et al., 1992).

$$PLC = [(0,432+0,1625) \times EEL] \times PL$$

**PLC** = Produção de leite corrigido para 3,5% de gordura

**%EEL** = Teor de extrato etéreo do leite

**PL** = Produção de leite em kg/dia

Do 16º ao 19º dia de cada período experimental foram coletadas amostras do leite nas duas ordenhas diretamente dos copos coletores da ordenhadeira, para análises da composição de proteína, gordura, lactose, extrato seco, extrato seco desengordurado e ureia. As amostras foram acondicionadas em recipientes contendo o conservante bronopol®, refrigeradas a 5°C e enviadas ao Laboratório de Qualidade de Leite da Embrapa Gado de Leite em até 24 horas conforme procedimento recomendado pela EMBRAPA/CNPGL. As análises foram feitas em equipamento Bentley Combi System 2300® (BENTLEY INSTRUMENTS INC., 2007), seguindo as recomendações da International Dairy Federation (IDF, 2000).

A eficiência alimentar (EA) foi obtida pela seguinte fórmula:

$$EA = PL/CMS$$

**PL** = produção de leite, em kg/animal/dia

**CMS** = consumo de matéria seca, em kg/ animal/dia

## 2.6 Balanço de nitrogênio

Nos 18º ao 19º dia de cada período experimental, foram realizadas coletas spot de urina por meio de micção estimulada por massagem na vulva, 4 h após o fornecimento da alimentação da manhã, de modo que foram 6 horários pontuais de coleta (4, 8, 12, 16, 20 e 24 h) conforme metodologia de (Lee; Morris; Dieter, 2019).

As amostras foram filtradas em gaze e uma alíquota de 10 ml foi separada e diluída em 40 ml de ácido sulfúrico (0,018 M), para a quantificação das concentrações de nitrogênio total e creatinina. Outra alíquota de 40 ml foi armazenada sem a presença de ácido para a determinação de energia bruta, ambas foram armazenadas a -20°C para as posteriores análises.

No Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (Lafa/UESB), foram determinadas as concentrações de creatinina, utilizando-se kits comerciais (Bioclin®) e espectrofotometria conforme metodologias propostas por (Chen & Gomes, 1992).

Para o balanço de compostos nitrogenados (BN), quantificou-se o  $N_{\text{ingerido}}$ ,  $N_{\text{absorvido}}$  e  $N_{\text{retido}}$ . O  $N_{\text{absorvido}}$  foi calculado pela diferença do ( $N_{\text{ingerido}} - N_{\text{fecal}}$ ). O BN (g N/dia) foi calculada pela fórmula.

$$N_{\text{leite}} = PB_{\text{leite}} / 6,38$$

**6,38** = fator de conversão

$$BN = N_{\text{ingerido}} - (N_{\text{fecal}} + N_{\text{urinário}} + N_{\text{leite}})$$

A eficiência de N g/kg de leite produzido por dia de acordo Broderick (2003) pelo seguinte cálculo:

$$EN = g - N_{\text{leite}} / N_{\text{ingerido}}$$

A excreção de creatinina (mg/kg PC), utilizada para estimar o volume urinário e por intermédio das amostras spot foi obtida para cada animal, conforme equação sugerida por Chizzotti (2006).

$$EC = 32,27 - 0,01093 \times PC$$

**EC** = excreção diária de creatinina (mg/kg PC)

**PC** = peso corporal (kg)

O volume urinário foi estimado dividindo-se a excreção diária de creatinina (mg/kg PC) e concentração média de creatinina (mg/L) na urina spot, multiplicando-se pelo respectivo PC do animal.

## 2.7 Processamento de amostras e análises bromatológicas

Todas as amostras coletadas durante o experimento, ingredientes da ração, sobras e fezes foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas à pré-secagem, a 55°C, por 72 h. Posteriormente, foram moídas em moinho estacionário de facas, utilizando-se peneiras com crivos de 1 mm de diâmetro (Wiley mill; A. H. Thomas, Philadelphia, PA).

Após a moagem, foi realizada amostragem composta por animal e período. As proporções para constituição das amostras compostas de fezes e sobras foram calculadas com base na matéria pré-seca.

O material processado foi acondicionado em frascos plásticos herméticos identificados para posteriores análises químicas. As análises foram realizadas no Laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de leite e foram avaliados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (OM), nitrogênio total (NT), e extrato etéreo (EE), de acordo com os métodos 930,15, 942,05, 984,13 e 920,39 respectivamente, e o cálculo do teor de proteína bruta (PB) foi realizado multiplicando a concentração do NT pelo fator 6,25 (AOAC, 2005). A EB foi mensurada por combustão em bomba calorimétrica adiabática - marca IKA® WERKE /modelo C-5000 ADI, Control, (AOAC, 1995). As amostras de urina foram analisadas para determinação do de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1995) e energia bruta, conforme informações anteriores.

As análises de fibra foram realizadas no Laboratório de Forragicultura e Pastagem da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Para determinação da fibra em detergente neutro (FDN) foram adotados os procedimentos de Mertens (2002). A correção da FDN para os compostos nitrogenados e estimação dos conteúdos de compostos nitrogenados insolúveis nos detergentes neutro (NIDN) e ácido (NIDA) de acordo com Licitra et al. (1996).

Os CNF corrigidos (CNFcp) foram calculados pela equação proposta por Hall (2003), utilizando o FDNcp (Detmann et al., 2012), pela fórmula:

$$\text{CNF} = 100 - (\% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas} + \% \text{FDNcp}).$$

**%PB** = teor de proteína bruta,

**%EE** = teor de extrato etéreo

**%Cinzas** = teor de cinzas

**%FDNcp** = teor de fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína.

A estimativa da porcentagem de carboidratos totais (CT) foi obtida pela equação de (SNIFFEN et al., 1992):

$$\text{CT} = 100 - (\% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{MM})$$

## 2.8 Determinação e Partição energética

Primeiramente, por meio de calorímetro adiabático (IKA - C5000) determinou-se a energia bruta das amostras dos ingredientes da ração, sobras, fezes e urina coletadas no ensaio de digestibilidade. A partir da mensuração do consumo de energia bruta (CEB), obtida pela diferença entre o teor de energia fornecida na dieta e a encontrada nas sobras foram calculadas as demais frações de energia.

Os valores de energia digestível (ED) foram obtidos a partir da diferença entre o consumo de energia bruta (CEB) e a energia perdida nas fezes. Para energia metabolizável (EM), foram descontadas as perdas energéticas sob a forma de urina e CH<sub>4</sub> (NRC, 2001).

Para a quantificação da energia perdida na forma de CH<sub>4</sub>, considerou-se a perda de 9,45 kcal/L de CH<sub>4</sub> produzido (Brouwer, 1965) e densidade de 0,7143 g/L.

A metabolizabilidade (q) da dieta foi calculada pela relação entre a energia metabolizável e a energia bruta ingerida, conforme o AFRC (1993).

A energia líquida para lactação (ELL, Mcal/dia), definida como a energia contida no leite produzido, foi calculada de acordo a equação do NRC (2001), que considera a ELL como o somatório das energias da combustão dos constituintes do leite (gordura, proteína e lactose).

$$ELL = [((0,0929 \times \text{gordura manhã}) + (0,0547 \times \text{proteína manhã}) + (0,0395 \times \text{lactose manhã}) \times \text{produção de leite manhã}) + ((0,0929 \times \text{gordura tarde}) + (0,0547 \times \text{proteína tarde}) + (0,0395 \times \text{lactose tarde}) \times \text{produção de leite tarde})].$$

O balanço energético (BE) total foi calculado pela diferença entre CEM, a ELL e a produção de calor (Pcal).

$$BE = CEM - ELL - Pcal$$

Os volumes (L/dia) de O<sub>2</sub> consumido, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, produzidos durante o ensaio de respirometria e o nitrogênio urinário excretado (Nu, g/dia), foram utilizados para calcular a produção de calor diária (PCalor, Kcal/dia), conforme Brouwer (1965):

$$PCalor \text{ (Kcal/dia)} = (3,866 \times VO_2) + (1,200 \times VCO_2) - (0,518 \times VCH_4) - (1,431 \times Nu)$$
 em que: VO<sub>2</sub> = volume de oxigênio; VCH<sub>4</sub> = volume de metano; VCO<sub>2</sub> = volume de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (todos em L/dia) e Nu = nitrogênio urinário total.

Também foram estabelecidas as relações entre EM/ED; Pcal/EM, ELL/EM e BE/EM como indicadores de eficiência energética.

## 2.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa SAS (Version 9.1), por meio do procedimento MIXED considerando um modelo total. Na análise das médias das variáveis dependentes em função dos níveis de inclusão de APA (0; 5; 10 e 15 mg) utilizou-se contrastes polinomiais (L e Q).

Adotou-se como nível de significância 5% de probabilidade. Para as variáveis dependentes, cujos contrastes polinomiais foram significativos, foi realizada a análise de regressão dos efeitos de ordem linear (L) e quadrático (Q), em função dos níveis de APA, conforme modelo estatístico:

$$y_{ij(k)m} = \mu + SQ_m + ROW(SQ)_{im} + COL(SQ)_{jm} + \tau(k) + \varepsilon_{ij(k)m} \quad i, j, k = 1, \dots, r; m = 1, \dots, b$$

Onde:

$y_{ij(k)m}$  = observação  $ij(k)m$

$\mu$  = a média geral

$SQ_m$  = o efeito do m quadrado

$LINHA(SQ)_{im}$  = o efeito da linha i dentro do quadrado m

$COL(SQ)_{jm}$  = o efeito da coluna j dentro do quadrado m

$\tau(k)$  = o efeito do tratamento k

$\varepsilon_{ij(k)m}$  = erro aleatório com média 0 e variância  $\sigma^2$

$r$  = o número de tratamentos, e o número de linhas e colunas dentro de cada quadrado

$b$  = o número de quadrados.

### 3. RESULTADOS

Os níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) não afetaram ( $P > 0,05$ ) a ingestão de água, o consumo e digestibilidade da matéria seca (MS) e demais componentes nutricionais, bem como o tempo de atividades comportamentais (Tabela 3). Entretanto, o tempo destinado à ruminação apresentou decréscimo de 2,43 minutos por dia ( $P = 0,032$ ) para cada unidade de inclusão de APA na dieta.



Tabela 3- Consumo, digestibilidade de nutrientes e comportamento alimentar em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de alcaloides piperídnicos de algaroba (APA).

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5vs10+15	L	Q
	Consumo (kg/dia)								
Água	61,63	64,86	65,28	66,96	6,91	0,274	0,614	0,087	0,706
MS	17,89	20,01	19,64	18,39	0,43	0,092	0,322	0,741	0,065
MSD	10,35	11,38	10,75	10,90	0,25	0,106	0,299	0,603	0,316
MO	17,9	19,15	18,61	18,05	0,35	0,194	0,318	0,972	0,183
FDNcp	5,87	6,25	6,10	5,95	0,11	0,222	0,393	0,934	0,226
CNF	7,73	8,30	8,03	7,76	0,15	0,179	0,262	0,878	0,159
PB	3,13	3,34	3,60	3,54	0,13	0,468	0,371	0,119	0,512
EE	1,16	1,24	1,21	1,17	0,22	0,189	0,353	0,969	0,165
	Digestibilidade (g/kg)								
MS	533,0	547,5	530,6	557,7	0,81	0,334	0,794	0,233	0,550
MO	564,3	568,8	556,3	581,5	0,87	0,767	0,994	0,421	0,343
FDNcp	375,1	380,6	365,4	416,3	1,24	0,810	0,606	0,147	0,172
FDA	226,3	219,4	209,8	238,4	1,07	0,774	0,820	0,725	0,305
CNF	677,4	697,8	663,7	674,4	1,08	0,449	0,226	0,612	0,797
PB	577,8	590,4	605,4	620,2	1,35	0,597	0,281	0,071	0,944
EE	718,0	708,3	721,2	765,8	1,48	0,800	0,294	0,206	0,321
	Escore de comportamento (min/dia)								
RUM	569,49	578,80	536,71	543,00	8,26	0,934	0,493	0,032 <sup>1</sup>	0,898

EPM – erro padrão da média; MS - matéria seca; MSD – matéria seca digestível; MO - matéria orgânica; FDNcp - fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas; CNF - carboidratos não fibrosos; PB - proteína bruta; EE - extrato etéreo; FDA - fibra em detergente ácido; RUM – ruminação; <sup>1</sup>y= 575,23-2,4312x; R<sup>2</sup>=0,5964.

As produções de leite em kg/dia e corrigida para energia e variação de peso corporal foram influenciadas e apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,039$ ;  $P = 0,047$  e  $P = 0,014$ ) com a inclusão de APA nas dietas (Tabela 4), estimando-se máxima de produção de leite nas concentrações de (8,4; 8,0 e 8,6) mg/kg do aditivo, respectivamente. Entretanto, a composição do leite e a eficiência alimentar obtida considerando o consumo de matéria seca digestível e de nitrogênio, não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) com os níveis de APA. Os teores de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e desengordurados apresentaram médias de 3,6%, 3,1% 4,5%, 12,3% e 8,7% respectivamente e não houve variação ( $P > 0,05$ ) na presença do APA nas dietas.

Tabela 4 - Produção, composição do leite, eficiência alimentar e variação de peso corporal em vacas lactantes alimentadas com dieta contendo níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5 vs 10+15	L	Q
	kg/dia								
PL	20,14	22,12	21,57	21,09	0,52	0,021	0,256	0,360	0,039 <sup>1</sup>
LCE	20,94	22,71	22,41	21,48	0,59	0,063	0,331	0,646	0,047 <sup>2</sup>
	Composição (%)								
Gordura	3,72	3,65	3,77	3,50	0,07	0,688	0,904	0,316	0,404
Proteína	3,18	3,15	3,13	3,22	0,45	0,839	0,870	0,856	0,564
Lactose	4,62	4,55	4,62	4,53	0,02	0,246	0,638	0,286	0,817
EST	12,44	12,31	12,34	12,20	0,09	0,663	0,896	0,490	0,997
ESD	8,77	8,65	8,71	8,68	0,04	0,444	0,725	0,690	0,671
	Eficiência alimentar								
PL/CMSD	1,95	1,96	2,03	1,93	0,04	0,880	0,814	0,950	0,394
NL/NI	0,20	0,21	0,19	0,20	0,00	0,866	0,471	0,615	0,858
VPC	-9,50	11,46	7,81	1,62	3,05	0,017	0,235	0,431	0,014 <sup>3</sup>

PL - produção de leite; LCE - produção de leite corrigido para energia; EST - extrato sólidos totais; ESD - extrato sólidos desengordurado; CMSD - consumo de matéria seca digestível; NL - nitrogênio no leite; NI - nitrogênio ingerido; VPC - variação de peso corporal. <sup>1</sup>y=20,27+0,415x-0,0246x<sup>2</sup>; R<sup>2</sup>=0,8402; <sup>2</sup>y=21,012+0,4314x-0,027x<sup>2</sup>; R<sup>2</sup>=0,9485; <sup>3</sup>y=-8,3965+4,6667-0,2715x<sup>2</sup>; R<sup>2</sup>=0,9037.

O nitrogênio (N) ingerido, digerido e as excreções de N-total urinário, N-fecal, N-leite e N-ureico na urina não foram alterados (P > 0,05) com níveis de APA nas dietas quando expressos em g/dia apresentaram as respectivas médias de 544,9; 0,53; 212,1; 105,7 e 107,3 (Tabela 5). Por outro lado, houve efeito linear crescente (P = 0,015) para a o nitrogênio ureico no leite (NUL, g/dia). Também não houve efeito (P > 0,05) dos níveis de APA para o N-fecal, N-urinário e N-leite em percentual do N ingerido (Tabela 5).

Tabela 5 - Partição de compostos nitrogenados em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5vs10+15	L	Q
	g/dia								
NI	500,9	535,2	576,6	566,8	21,1	0,468	0,373	0,121	0,508
NU	452,6	603,0	524,0	483,5	53,7	0,155	0,271	0,966	0,198
NF	210,5	218,9	214,4	205,5	6,03	0,582	0,498	0,682	0,424
NL	100,8	109,2	106,0	107,0	3,22	0,205	0,632	0,451	0,425
NUL	2,60	3,43	4,03	3,87	0,19	0,124	0,255	0,015 <sup>1</sup>	0,189
NUU	118,6	113,3	85,51	112,0	6,24	0,696	0,228	0,277	0,113
ND	290,4	316,3	362,2	361,3	22,4	0,563	0,249	0,081	0,671
	N % do NI								
NF/NI	42,21	40,95	39,45	37,97	1,35	0,597	0,281	0,071	0,944
NU/NI	0,08	0,11	0,10	0,09	0,01	0,193	0,341	0,983	0,183
NL/NI	20,67	21,04	19,83	20,53	0,69	0,809	0,518	0,735	0,879

NI - nitrogênio ingerido; NU - nitrogênio urinário; NF - nitrogênio fecal; NL - nitrogênio do leite; NUL - nitrogênio ureico no leite; ND - nitrogênio digerido; NUU - nitrogênio ureico na urina. Y<sup>1</sup>=2,821+0,0882x; R<sup>2</sup>=0,7896.

Os consumos de energia bruta, digestível e metabolizável expressos em Mcal/dia foram influenciados e apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,030$ ;  $P = 0,048$  e  $P = 0,035$ ) com a inclusão de APA nas dietas experimentais, sendo os pontos máximos de consumo nas concentrações de 6,4; 6,3 e 6,1 mg/kg do aditivo, respectivamente (Tabela 6). As perdas energéticas em percentual de energia bruta consumida (CEB), bem como os parâmetros de uso de energia não variaram ( $P > 0,05$ ) com a presença do APA nas dietas experimentais. No entanto, comparando-se APA 5 mg/kg com APA 10 e 15 mg/kg observou-se menor ( $P < 0,05$ ) perda de energia na forma de metano, maior ( $P < 0,05$ ) metabolizabilidade e balanço de energia para dieta com APA na concentração de 5 mg/kg.

Tabela 6 - Partição e índices de eficiência energética em vacas lactantes alimentadas com dieta contendo níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).

Item	APA (mg/kg de MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5 vs 10+15	L	Q
Consumo e perdas de energia (Mcal/dia)									
EB	82,31	91,12	85,00	79,31	1,69	0,057	0,028	0,281	0,030 <sup>1</sup>
EF	40,15	42,26	42,02	38,97	1,12	0,403	0,418	0,630	0,157
ED	42,16	48,86	42,98	40,34	1,18	0,045	0,016	0,262	0,048 <sup>2</sup>
ECH <sub>4</sub>	4,00	3,94	4,29	3,99	0,10	0,601	0,191	0,551	0,339
EU	2,11	2,81	1,75	2,98	0,28	0,414	0,549	0,559	0,652
EM	36,04	42,10	36,93	33,36	1,07	0,056	0,015	0,175	0,035 <sup>3</sup>
ELL	14,58	14,25	15,05	13,98	0,34	0,759	0,776	0,771	0,634
PC	12,77	12,76	13,11	12,20	0,83	0,986	0,913	0,685	0,554
Perdas de energia (%EB)									
EF	48,87	46,33	49,55	49,16	1,08	0,223	0,101	0,529	0,458
CH <sub>4</sub>	4,87	4,38	5,04	5,03	0,11	0,128	0,024	0,250	0,286
EU	2,50	3,10	2,01	3,87	0,34	0,562	0,854	0,365	0,396
IC	15,57	14,29	15,37	15,46	0,50	0,437	0,431	0,885	0,553
Uso da energia									
EM/ED	0,85	0,86	0,86	0,82	0,00	0,758	0,279	0,143	0,131
q (EM/EB)	0,43	0,46	0,43	0,41	0,01	0,228	0,049	0,190	0,188
ELL/CEB	0,17	0,15	0,17	0,17	0,00	0,100	0,076	0,725	0,292
BE(Mcal/dia)	8,67	15,09	9,15	7,17	1,38	0,095	0,037	0,373	0,120

EB – energia bruta; EF – energia fecal; ED – energia digestível; %EB – porcentagem de energia de energia bruta; ECH<sub>4</sub> – energia na forma de metano; IC – incremento calórico; EU – energia urinária; EM – energia metabolizável; q – metabolizabilidade; ELL – energia líquida de lactação; BE – balanço energético.  $Y^1=83,078+1,8726x-0,145x^2$ ;  $R=0,8444$ ;  $y^2=42,951+1,1742x-0,0934x^2$ ;  $R=0,6929$ ;  $y^3=36,682+1,1803x-0,0963x^2$ ;  $R^2=0,795$ .

## 1. DISCUSSÃO

Possivelmente, a mesma composição das dietas assegurou a similaridade para o consumo e digestibilidade da MS e, conseqüentemente, dos demais componentes nutricionais. Em ruminantes, a ingestão e a digestibilidade dos nutrientes podem estar correlacionadas de maneira positiva ou negativa entre si, como consequência de efeitos

associativos, os quais dependem da qualidade da dieta e do uso de modificadores da microbiota ruminal (Cruz et al., 2011; Moreno et al., 2010).

Na avaliação de aditivos alimentares fitogênicos deve-se destacar a importância de não influenciar negativamente o consumo voluntário dos animais. Como a ingestão de ruminantes sofre controle por fatores físicos e químicos da dieta, os aditivos alimentares podem afetar o consumo por alteração do sabor, por modificação da fermentação ruminal, consequências metabólicas e intoxicação. Bovinos de leite são altamente sensíveis às mudanças de sabor (Vieira, 2010; Maggioni et al., 2009).

Consistentemente, ovinos também não apresentaram alteração de consumo e de digestibilidade da MS, MO e FDNcp em dietas com proporção média de 63% de concentrado e 37% de volumoso e aditivadas com doses entre 6,6 e 31,5 mg/kg MS de APA (Brito et al., 2020; Sousa et al., 2022). Em contrapartida, esses estudos mostraram variação na digestibilidade de PB das dietas com o uso de APA, com efeito para aumento linear, da mesma forma, nesse estudo, foi observada tendência para o incremento linear de acordo com os níveis de APA entre 5 e 15 mg/kg.

Assim como, nesse estudo não houve efeito de APA sobre a digestibilidade da MS e nutrientes, outras pesquisas com diversos aditivos convencionais e fitogênicos em dietas para vacas leiteiras, não mostraram alteração nos parâmetros supracitados (Akins et al., 2014; Branco et al., 2015; Coutinho et al., 2014; Oliveira et al., 2005; Prado et al., 2015; Vendramini et al., 2016; Zilio et al., 2019).

A redução de 6% no tempo despendido com ruminação para animais suplementados com o maior nível de APA pode ter refletido em menor gasto energético pelos animais no processamento da digesta. O tempo médio de 9,2h destinado a ruminação, está de acordo com o relatado por Marques et al. (2005), em que o tempo total destinado com ruminação pode alcançar até nove horas.

Diferentemente dos resultados obtidos com vacas, Brito et al. (2020) não verificaram influência de APA (31,5 mg/kg MS) no tempo de ruminação de ovinos. Por outro lado, Geron et al. (2014) reportaram aumento do tempo de ruminação de novilhas suplementadas com diferentes aditivos (extrato de própolis e monensina).

O APA atua na membrana celular e pode afetar atividade de canais iônicos, especialmente de cálcio, e assim agir contra bactérias sensíveis, cuja membrana plasmática se encontra mais exposta aos alcaloides, podendo atuar na modificação de fermentação ao selecionar bactérias do rúmen resistentes (Choudhary et al., 2005; Santos et al., 2013; Reina et al., 2016; Pereira et al., 2017; Efimova et al., 2020).

Entretanto, é possível sugerir que apesar de os níveis de APA não afetarem a digestibilidade total de nutrientes, os resultados mostraram variação na utilização de energia e proteína da dieta, possivelmente, como reflexo de alteração no padrão de fermentação no rúmen. Isso pode ser evidenciado pela menor perda de energia na forma de metano relativa à ingestão de energia bruta na dieta com APA 5 mg/kg. Em adição, APA nessa concentração foi eficiente no aproveitamento da energia digestível e metabolizável para obtenção de maior produção de leite e variação de peso corporal.

Estimou-se que vacas lactantes alimentadas com dietas suplementadas com APA 8,4 mg/kg produziu 8,6% a mais de leite quando comparadas ao grupo da dieta sem a presença do aditivo, o que pode ser reflexo da maior disponibilidade e aproveitamento da energia metabolizável consumida. Nesse estudo, o aumento percentual foi superior aos valores mostrados em pesquisas com monensina na dieta de vacas leiteiras, que apresentaram variação de (0,7 a 1,3 kg/dia) ou 5% maior quando se comparou com dietas sem adição de monensina (Duffield et al., 2008; Ipharraguerre; McGuffey et al., 2001).

Santos et al. (2021) observaram que o nível de adição de APA 9,2 mg/kg de MS em dietas compostas por 40% de volumoso e 60% de concentrado aumentou o ganho de peso final de cordeiros. No rúmen de ovinos, essa dose atinge em torno de 0,92 mg/kg de digesta ruminal, sendo que, os autores destacaram a necessidade de mais estudos com maiores doses. Os níveis utilizados no presente estudo representam as concentrações aproximadas de 1, 2 e 3 mg de APA/kg de digesta ruminal nas vacas. Portanto, evidenciou-se que as concentrações de APA acima de 1 mg/kg no rúmen não aumentaram o desempenho produtivo de forma linear. Contudo, os resultados indicaram que APA promoveu variação quadrática nos parâmetros de desempenho, sendo que, os níveis superiores a 5 mg/kg proporcionaram menores consumos de energia digestível e metabolizável que a dieta sem aditivos, porém mantiveram a produção de leite corrigido para energia.

Importante destacar que normalmente o aumento na produção de leite é acompanhado pelo efeito de diluição em razão das reduções das concentrações da gordura e proteína. Entretanto, nesse estudo com uso do APA em dietas para vacas leiteiras não foi observado o efeito de diluição, conseqüentemente, pode ser visto como vantagem econômica para produtores que recebem bonificação na venda do leite em função da qualidade. APA assegurou os percentuais de 3,0% para gordura, 2,9% para proteína e 8,4% para sólidos desengordurados, os quais estão de acordo com os valores mínimos estabelecidos pela Instrução Normativa 76 (MAPA, 2018). Diferentemente da gordura, a

lactose é um dos componentes mais estáveis na composição do leite, tendo pouca influência de ordem dietética. Assim, era previsível a ausência de variação na concentração da lactose, que apresentou média de 4,5%, aproximando-se do valor de 4,8% preconizado pelo NRC (2001).

A similaridade para os percentuais de sólidos totais (EST) e sólidos desengordurados (ESD) é atribuída à inalteração dos demais constituintes avaliados. Além disso, segundo Almeida (2014), a semelhança para EST e ESD pode ser reflexo da não limitação do aporte de nutrientes para o animal e especialmente para a glândula mamária.

Concentrações de NUL são correlacionadas com o teor de nitrogênio amoniacal no fluido ruminal e formação hepática de ureia (NRC, 2001). Nesse sentido, APA adicionado a 5 mg/kg MS pode ter melhorado a utilização metabólica de nitrogênio.

Segundo Van Soest (1994) e Hoffman et al. (2001), existe uma relação proporcional da ingestão de nitrogênio e a excreção de nitrogênio urinário e fecal, além da digestibilidade do nitrogênio poder ser constante. No presente trabalho a similaridade no consumo pode ter assegurado a inalteração da excreção fecal e urinária de nitrogênio e a tendência de aumento na digestibilidade de PB pode parcialmente explicar a elevação do NUL com os níveis de APA na dieta.

Em estudos de Sousa et al. (2022), foi observada melhoria na retenção de nitrogênio em razão da redução de até 16% do nitrogênio excretado nas fezes de ovinos suplementados com APA até 27,8 mg/kg MS quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, esses autores não observaram alteração do BN em ovinos com níveis de APA até 9,2 mg/kg MS de dieta.

O extrato de alcaloides de algaroba a 5 mg/kg MS melhorou a eficiência energética, uma vez que, reduziu a perda de energia na forma de CH<sub>4</sub>, aumentou a metabolizabilidade e o balanço de energia. Resultados se assemelham aos encontrados por Sousa et al. (2022) em pesquisa com ovinos alimentados com dietas suplementadas com APA. Destaca-se que a fração da EB consumida perdida nas fezes de 48,4%, foi inferior ao valor de 65% frequentemente encontrado na literatura para animais alimentados com dietas compostas por forrageiras tropicais.

## 5 . CONCLUSÕES

O consumo de energia metabolizável e a produção de leite são maiores quando APA é adicionado a 5 mg/kg MS da ração. Adicionalmente, a dose de APA 5 mg/kg, não reduz o o tempo gasto com ruminação e não altera a perda de energia bruta como metano.

## 6 – REFERÊNCIAS

AFRC - AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. **Energy and requirements of ruminants**. Wallingford, CAB INTERNATIONAL. 1993, p.159.

AOAC - Association Official of Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16th edition. **Association of Official Analytical Chemists**. Arlington, VA, 1995.

AOAC - Association Official of Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18th edition. **Association of Official Analytical Chemists**. Arlington, VA, 2005.

AKINS, M. S.; PERFIELD, K. L.; GREEN, H. B.; BERTICS, S. J.; SHAVER, R.D. Effect of monensin on lactating dairy cow diets at 2 starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 917-929, 2014.

ALMEIDA, G.F. Sementes oleaginosas na alimentação de vacas em lactação. **Dissertação de mestrado**. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal. 80f. 2014.

BRANCO, A.F., GIALLONGO, F., FREDERICK, T., WEEKS, H., OH, J., HRISTOV, A.N. Effect of technical cashew nut shell liquid on rumen methane emission and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.98, p. 4030-4040, 2015.

BRITO, E. F.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, H. G. O.; SOARES, A. C. M.; CORREIA, G. S.; SOUSA, L. B.; SOUZA, L. B.; SOARES, V. P. S.; DE PAULA, V. F. Effects of enriched mesquite piperidine alkaloid extract in diets with reduced crude protein concentration on the rumen microbial efficiency and performance in lambs. **Czech Journal of Animal Science**, v. 65, p. 268-280, 2020.

BRODERICK, G.A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1370-1381, 2003.

BROUWER, E. Report of Sub-Committee on Constants and Factors. Proc 3rd Symp. **On Energy Metabolism**, EAAP Publ. N° 11. p. 441-443, 1965.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. Bucksburn: **Rowett Research Institute**, 1992. 21p.



CHIZZOTTI, M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; CHIZZOTTI, F. H. M.; CAMPOS, J. M. S.; MARCONDES, M. I.; FONSECA, M. A. Intake, digestibility and urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights. **Revista Brasileira Zootecnia**. v.35, p.1813 - 1821, 2006.

CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; AZIM, M. K.; GHAYUR, M. N.; LODHI, M. A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B. M.; AHMAD, V. U. Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 332: 1171 - 1179, 2005.

COUTINHO, D. A.; BRANCO, A. F.; SANTOS, G. T.; OSMARI, M. P.; TEODORO, A. L.; DIAZ, T. G. Intake, digestibility of nutrients, milk production and composition in dairy cows fed on diets containing cashew nut shell liquid. **Acta Scientiarum**, v. 36, p. 311 - 316, 2014.

CRUZ, B. C. C.; SANTOS-CRUZ, C. L.; PIRES, A. J. V.; ROCHA, J. B.; SANTOS, S.; BASTOS, M. P.V. Desempenho, consumo e digestibilidade de cordeiros em confinamento recebendo silagens de capim elefante com diferentes proporções de casca desidratada de maracujá. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1595-1604, 2011.

DE SOUZA, J.; PRÉ-SEAULT, C. L.; LOCK, A. L. Altering the ratio of dietary palmitic, stearic, and oleic acids in diets with or without whole cottonseed affects nutrient digestibility, energy partitioning, and production responses of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 172 - 185, 2018.

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, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para análises de alimentos** - INCT – Ciência Animal. Editora UFV. 2012. 214 p.

DUFFIELD, T.F.; RABIEE, A.; LEAN, I.J. A meta-analysis of the impact of monensin in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1347 - 1360, 2008.

GARCIA, W. R. Processamento da soja grão e do caroço de algodão em dietas de vacas leiteiras. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Lavras. 91f. 2005.

GERON, L.J.V.; ZEOULA, L.M.; YOSHIMURA, E.H.; FRANCO, S.L.; NETO, M.C.; PAULA, E.M.; SAMENSARI, R.B.; PERES, L.P. Comportamento ingestivo de novilhas Nelore em pastejo recebendo suplemento a base de própolis ou monensina sódica. Semina: **Ciências Agrárias**, v.35, p.2047 - 2061, 2014.

HALL, M. B. Challenges with nonfiber carbohydrate methods. **Journal of Animal Science**, v.81, n.12, p.3226 - 3232, 2003.

HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; BAUMAN, L.M. et al. Short communication: effect of dietary protein on growth and nitrogen balance of Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.843-847, 2001.

IDF - INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **International Standard 141C:2000**. Whole milk – Determination of milkfat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Bruxelas: International Dairy Federation, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI), PEREIRA, M. L. A.; BATISTA, R. **Aditivo à base de extrato vegetal em rações, utilizado como modificador da fermentação ruminal para melhoria do desempenho animal e mitigação da emissão de gases entéricos de efeito estufa**. BR 10 2012 030155-5, 27, 2014.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Anim. Feed Sci. Technol.** v. 106, p. 30 - 57, 2003.

JOUE - JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPÉIA. **Regulamento (CE) n° 1831/2003** do Parlamento Europeu e do Conselho da União Europeia de 22 de setembro de 2003. Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal.

LEE, C.; MORRIS, D. L.; DIETER, P. A. Validating and optimizing spot sampling of urine to estimate urine output with creatinine as a marker in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 31, p. 22 - 32, 2018.

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

MAGGIONI, D.; MARQUES, J. A.; ROTTA, P. P.; ZAWADZKI, F.; ITO, R. H.; PRADO, I. N. Ingestão de alimentos. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 30, p. 963 - 974, 2009.

MAMMI, L. M.; GUADAGNINI, M.; MECHOR, G.; CAINZOS, J. M.; FUSARO, I.; PALMONARI, A.; FORMIGONI, A. The use of monensin for ketosis prevention in dairy cows during the transition period: a systematic review: uma revisão sistemática. **Animals**, v. 11, p. 1988, 2021.

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Instrução Normativa n° 76, do regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite cru refrigerado, leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. **Diário Oficial da União**, Brasília - DF, 2018.

MARQUES, J. A.; MAGGIONI, D.; ABRÃO, J. J. S.; GUILHERME, E.; BEZERRA, G. A.; LUGÃO, S. M. B. Comportamento de touros jovens em confinamento alojados

isoladamente ou em grupo. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, Mayaguez, v. 13, p. 97 - 102, 2005.

McGUEFEY, R. K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: Currents status and future outlook. **Journal of Animal Science**. v. 84, p. 194 - 203, 2001.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v.85, p.1217 - 1240, 2002.

MORENO, G. M. B.; SILVA SOBRINHO, A. G.; LEÃO, A. G.; LOUREIRO, C. M. B.; PEREZ, H. L.; ROSSI, R. C. Performance, digestibility and nitrogen balance of lambs fed corn silage or sugar cane based diets with two levels of concentrate. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 853 - 860, 2010.

NRC – National Research Council. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7<sup>th</sup> ed. rev. Washington, DC, USA: National Academies Press; 2001. 408 p.

OLIVEIRA, A. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H. G. O.; SILVA, E. R.; DUTRA, I. C.; CORREIA, G. S.; SOARES, V. P. S.; OLIVEIRA, K. P.; PORTO, M. R. Enriched Mesquite Piperidine Alkaloid Extract Improves the Performance in Growing Goats. **International Journal of Environmental and Agriculture Research**, v. 7, p. 77-90, 2021.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 6, p. 1 - 23, 2005.

OTT-LONGONI, R., VISWANATHAN, N., HESSE, M. A estrutura do alcaloide juliprosopine da *Prosopis juliflora* A. DC. **Helvetica Chemica Acta**, v. 63, p. 2119 – 2129, 1980.

PATRA, A.K., SAXENA, J. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, p. 204 - 219, 2009.

PEREIRA, T. C. J.; PEREIRA, M. L. A.; MOREIRA, J. V.; AZEVÊDO, J.A.G.; BATISTA, R.; DE PAULA, V. F.; OLIVEIRA, B. S.; SANTOS, E. J. Effects of alkaloid extracts of mesquite pod on the products of in vitro rumen fermentation. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, p. 4301 - 4311, 2017.

PRADO, R. M.; CÔRTEZ, C.; BENCHAAAR, C.; PETIT, H.V. Interaction of sunflower oil with monensin on milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows. **Animal Feed and Technology**. v. 207, p. 85 - 92, 2015.

RABIEE, A.R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDBER, H.M.; BLOCK, E.; LEAN, I.J. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A metaanalysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3225 - 3247, 2012.

RUFINO JUNIOR, J; CARVALHO, D.M.G; SOUZA, J.G.; CABRAL, L.S.; SILVA, J.J.; RIBEIRO, M.D.; ARNOLDO, T.L.Q.; OLIVEIRA, A.S.; SOARES, J.Q. Caroço de algodão em dietas sem volumoso para cordeiros confinados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, p. 2727 - 2738, 2015.

SANTOS, E. T.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, C. F. P. G.; SOUZA-NETA, L. C.; GERIS, R.; MARTINS, D.; SANTANA, A. E. G.; BOABOSA, L. C. A.; SILVA, H. G. O.; FREITAS, G. C.; FIGUEIREDO, M. P.; OLIVEIRA, F. F.; BATISTA, R. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 8496 - 8516, 2013.

SANTOS, J. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H.G.O.; SANTOS, O. O.; CARVALHO, G. G. P.; ALMEIDA, J. R. F. A.; SILVA, R. P.; RIBAS, K. P. O. Supplementation with mesquite alkaloids extract in diets for lambs fed Bermuda grass improves growth performance. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106 - 560, 2021.

SILVA, J.F. C, LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Editora Livrocere. 1979. 380 p.

SKLAN, D.; ASHKENNAZI, R.; BRAUN, A.; DEVORIN, A.; TABORI, K. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2463 - 2472, 1992.

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, p.3562 - 3577, 1992.

SOUSA, L. B.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, H. G. O.; SOUSA, L. B.; SILVA, L. S.; MACHADO, F. S.; TOMICH, T. R.; OSS, D. B.; FERREIRA, A. L. CAMPOS, M. M.; COSTA, I. C.; PEREIRA, L. G. R. *Prosopis juliflora* piperidine alkaloid extract levels in diet for sheep change energy and nitrogen metabolism and affect enteric methane yield. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022

SULLIVAN H. M.; BERNARD J. K.; AMOS H. E.; JENKINS T. C. Performance of lactating dairy cows fed whole cottonseed with elevated concentrations of free fatty acids in the oil. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 665 - 671, 2004.

TALPADA, P. M. AND P. C. SHUKLA. Influence of feeding ground *Prosopis juliflora* pods to lactating cows on feed and ruminal utilization for milk production. **Indian Journal of Dairy Science**. V. 41, p. 274 - 277, 1988.

VALADARES FILHO, S. C.; MACHADO, P. A. S.; CHIZZOTTI, M. L.; AMARAL, H. F.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CAPELLE, E. R. CQBAL 3.0. **Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Bovinos 2015**. Disponível em: <http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/index.php>. Acesso em 25 de jan. de 2022.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2th London: Cornell University, 476p, 1994.

VENDRAMINI, T. H. A.; TAKIYA, C. S.; SILVA, T. H.; ZANFERARI, F.; RENTAS, M. F.; BERTONI, J. C.; CONSENTINI, C. E. C.; GARDINAL, R.; ACEDO, T. S.; RENNÓ, F. P. Effects of a blend of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. **Animal Feed and Technology**, v. 214, p. 12 - 21, 2016.

VIEIRA, S. L. **Consumo e preferência alimentar dos animais domésticos**. Londrina: Phytobiotics Brasil, 2010. 315p.

ZILIO, E. M. C., T. A. DEL VALLE, L. G. GHIZZI, C. S. TAKIYA, M. S. S. DIAS, A. T. NUNES, G. G. SILVA, AND F. P. RENNÓ. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. **Journal of dairy science**, v.102, p. 4189, 2019.

## IV - CAPÍTULO II

### **Níveis de extrato alcaloídico de algaroba em dieta com caroço de algodão para vacas lactantes afetam a composição de ácidos graxos do leite e o rendimento de metano**

#### **RESUMO**

Objetivou-se avaliar os efeitos de níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) em dieta de vacas lactantes sobre o metabolismo ruminal, perfil de ácidos graxos do leite, trocas gasosas e rendimento de metano entérico. As dietas experimentais consistiram em níveis de APA: 0 (dieta controle sem aditivo), 5, 10 e 15 mg/kg de matéria seca (MS). Foram utilizadas quatro vacas primíparas da raça Holandês e quatro múltiparas Girolando (3/4 Holandês x 1/4 Gir), alojadas em galpão *free stall*, com peso corporal médio de  $576,5 \pm 70$  kg, produção de leite média diária de  $20,7 \pm 2,2$  kg e média de  $132,8 \pm 25,7$  dias em lactação. Foram distribuídas em dois quadrados latinos balanceados (4 x 4), em um período experimental de 84 dias, divididos em 4 períodos de 21 dias, com 15 dias de adaptação e 6 para coleta de amostras. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo SAS, sendo as médias das variáveis dependentes em função dos níveis de inclusão de APA. A produção de leite em kg/dia corrigida para 3,5% de gordura, os teores de C16:1+C17 e C16:1c9+C17 anteiso apresentaram variações quadráticas ( $P = 0,020$ ;  $P = 0,040$  e  $P = 0,046$ ), e pontos de máximos de 7,7; 6,0 e 6,5 mg/kg respectivamente, com a inclusão de APA nas dietas. A emissão diária de metano (g/dia; g/kgPC<sup>0,75</sup> e g/kg de leite), assim como a produtividade de metano por consumo e por fração digestível de MS, MO, FDN e CNF não foram influenciadas ( $P > 0,05$ ) pelos níveis de APA. Entretanto, a dose de APA 5 mg/kg mostrou menor ( $P < 0,05$ ) rendimento de CH<sub>4</sub> (g/dia) por nutrientes ingeridos (kg/dia) e pelas suas frações digestíveis em comparação com as doses de APA 10 e 15 mg/kg. A suplementação de dieta contendo caroço de algodão para vacas com APA 5 mg/kg aumenta a produção de leite corrigida pra 3,5% de gordura e o teor de C16:1c9+C17 anteiso do leite e mostra potencial para redução do rendimento de metano entérico.

Palavras-chave: eficiência microbiana, parâmetros ruminais, *Prosopis juliflora*, respirometria

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of enriched extract of mesquite piperidine alkaloids (APA) in the diet of lactating cows on rumen metabolism, milk fatty acid profile, gas exchange and enteric methane yield. The experimental diets consisted of: control diet without additive; with APA 5, 10 and 15 mg/kg of dry matter (DM). Four primiparous Holstein cows and four multiparous Girolando cows (3/4 Holstein x 1/4 Gyr) were housed in a free stall, with an average body weight of  $576,5 \pm 70$  kg, with an average daily milk production of  $20,7 \pm 2.2$  kg and a mean of  $132,8 \pm 25,7$  days in lactation. They were distributed in two balanced Latin squares (4 x 4), in an experimental period of 84 days, divided into 4 periods of 21 days, with 15 days of adaptation and 6 days for sample collection. The results were submitted to statistical analysis by the SAS, with the means of the dependent variables depending on the levels of APA inclusion. Milk production in kg/day corrected for 3.5% fat, of total C16 and anteiso C16:1+C17 contents showed quadratic variations ( $P = 0.020$ ;  $P = 0.040$  and  $P = 0.046$ ), respectively, with the inclusion of APA in diets. Daily methane emission (g/day; g/kg BW<sup>0.75</sup> and g/kg of milk), as well as methane productivity by consumption and by digestible fraction of DM, MO, NDF and NFC, as well as for daily milk production and metabolic weight were not influenced ( $P > 0.05$ ) by APA levels. However, the APA dose of 5 mg/kg showed lower ( $P < 0.05$ ) CH<sub>4</sub> yield (g/day) per ingested nutrients (kg/day) and its digestible fractions compared to doses of 10 and 15 mg/day kg. Diet supplementation containing cottonseed for APA cows increases milk production corrected to 3.5% fat, modifies the fatty acid profile of milk and shows potential for reduced enteric methane yield.

Keywords: gas exchange, microbial efficiency, rumen parameters, *Prosopis juliflora*, respirometry

## 1. INTRODUÇÃO

O setor agropecuário é apontado entre as principais fontes de emissão de gases de efeito estufa (GEE) como consequência de maior demanda por alimentos, devido ao crescimento demográfico e nível de consumo em constante aumento. A produção animal é uma das principais fontes de emissão de metano ( $\text{CH}_4$ ), considerado como poluente da atmosfera de meia-vida curta. Em 2017, a produção mundial de metano ( $\text{CH}_4$ ) entérico pela bovinocultura leiteira foi de 18,7 milhões de toneladas, das quais o Brasil respondeu por 1,2 milhões (FAO, 2020). Uma nova alternativa à mitigação de emissão de GEE é a redução dos chamados poluentes de meia-vida curta (Artaxo, 2014).

O gás  $\text{CH}_4$  produzido na bovinocultura é originário, predominantemente, da fermentação entérica (85 a 90%), enquanto que, os dejetos contribuem com o restante. Do  $\text{CH}_4$  produzido a partir da fermentação entérica ruminal, 95% é excretado via eructação, e daquele produzido no trato digestivo posterior, 89% é excretado através da respiração e apenas 11% por flatulência (Gonçalves; Barcelos, 2014; Murray et al., 1976)

A emissão de  $\text{CH}_4$  é relacionada com a eficiência limitada da fermentação anaeróbica no rúmen, o que reflete na perda de carbono e, conseqüentemente, na perda da energia o que pode comprometer a sustentabilidade do sistema produtivo. Nesse processo fermentativo é dissipado calor pela superfície corporal e são produzidos  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ . Deste modo, mensurações realizadas em câmaras respirométricas mostram que os ruminantes perdem de 2% a 12%, ou até mais da energia bruta do alimento ingerido na forma  $\text{CH}_4$  (Johnson & Johnson, 1995).

O uso de aditivos alimentares é uma das estratégias de manipulação do perfil da fermentação ruminal, o que resulta na melhoria do aproveitamento energético e, por conguinte, reduz a emissão de GEE. Entretanto, existem restrições no uso desses aditivos convencionais como os ionóforos, sobretudo devido a possibilidade de seleção de microrganismos resistentes aos antibióticos, fator atrelado a segurança da saúde pública. Nesse sentido, observa-se na literatura o crescimento nas pesquisas com aditivos alimentares fitogênicos, o que caracteriza alternativa ao uso de aditivos obtidos por vias não naturais.



Todavia, é necessário destacar a inconsistência entre os resultados encontrados na literatura sobre o uso de substâncias fitogênicas adicionadas em dietas de ruminantes para suprimir CH<sub>4</sub>, provavelmente, em razão da alta variabilidade dos compostos, dosagens, e múltiplas interações entre dietas (Cobellis et al., 2016; Goel & Makkar, 2012).

Acrescenta-se ainda, que outros aspectos atuam na eficácia e amplitude de efeitos dos metabólitos secundários de plantas (MSP) usados na mitigação de CH<sub>4</sub>, como o tipo de composto, concentração na planta ou no extrato. A concentração do MSP difere, consideravelmente, entre espécies vegetais, variedades, ecótipos, cultivares, plantas individuais da mesma espécie ou entre partes da planta (Dorman & Deans, 2000; López et al, 2007; Patra & Saxena, 2010).

As piperidinas são MSP pertencentes ao grupo dos alcaloides heterocíclicos, que apresentam marcante lipofilicidade e polaridade contribuindo para sua incorporação nas membranas celulares, e podem afetar grandemente o funcionamento de vários canais iônicos. A ação de bloqueio de transporte de cálcio pelos alcaloides piperidínicos de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.) pode afetar tanto as bactérias Gram-positivas, quanto as arqueas metanogênicas (Choudhary et al., 2005; Vancek et al., 2006; Efimova et al., 2020).

Nesse sentido, inserem-se os estudos *in vitro* e em pequenos ruminantes com o uso de diferentes níveis (2,3 a 31,5 mg/kg de matéria seca da dieta) de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos (majoritariamente composto por juliprosinina e juliprosopina) provenientes de vagem de *P. juliflora*, que mostraram efeitos promissores ao aumentar a proporção molar de propionato, reduzir CH<sub>4</sub>, melhoria da utilização de proteína e energia da dieta e aumento de ganho de peso (Brito et al., 2020; Oliveira et al., 2021; Pereira et al., 2017; Santos et al., 2013; Santos et al. 2021).

Nessa pesquisa, objetivou-se avaliar o efeito da utilização de níveis de extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (*P. juliflora*) (APA) como aditivo alimentar em dietas de vacas lactantes sobre metabolismo ruminal e perfil de ácidos graxos do leite, trocas gasosas e rendimento de CH<sub>4</sub>.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos adotados com os animais nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil; Protocolo CEUA-EGL 9817210818).

### **2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal**

As vagens maduras de *Prosopis juliflora* Sw. D.C. foram obtidas no município de Brumado, Itapetinga e Manoel Vitorino, no estado da Bahia. Estas foram colhidas manualmente após caírem no chão, selecionadas apenas as que não apresentavam alterações visíveis no pericarpo e armazenadas.

Em uma lona plástica as vagens foram expostas ao sol e revolvidas diversas vezes, durante 5 dias para perda máxima de umidade antes do início do processamento. Este, ocorreu no Laboratório de Forragicultura da UESB, onde as vagens foram trituradas em picadeira estacionária. Posteriormente, foram processadas em moinho tipo de facas com utilização de peneira de 2 mm, obtendo-se a farinha integral, que foi embalada em sacos de polietileno e acondicionada em freezer a - 20°C para conservação.

### **2.2 Obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba**

No Laboratório de Fisiologia Animal da UESB, a farinha integral de algaroba, foi macerada com etanol 99%, durante 72 h, dessa feita, essa solução foi percolada e armazenada em recipientes fechados. Após a percolação, em evaporador rotatório a solução extraída foi concentrada a vácuo (-600 mmHg), em temperatura controlada de 40°C, obtendo-se, assim, o extrato etanólico bruto (EEB).

No processamento do EEB utilizaram-se soluções ácido-básicas e solventes orgânicos para obtenção dos extratos enriquecidos com alcaloides, seguindo a metodologia de Ott-Longoni et al. (1980) e para isolar os alcaloides piperidínicos de farinha integral de algaroba de acordo (INPI, 2014; SANTOS et al., 2013).

Solubilizou-se parte do EEB (100 g) em solução aquosa de ácido acético 1,6 M (AcOH, 200 ml), a solução resultante foi filtrada obtendo-se a solução aquosa ácida I (SAA-I). A SAA-I foi fracionada com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), em duas lavagens sucessivas de 150 ml, obtendo-se a solução aquosa ácida II (SAA II). A SAA II foi alcalinizada com hidróxido de sódio (NaOH) até atingir pH 9,0, passando a ser denominada de solução aquosa básica I (SAB I).

A SAB I passou por tripla lavagem com 100 ml de  $\text{CHCl}_3$ , obtendo-se a solução aquosa básica II (SAB II). Esta foi submetida à dupla lavagem com solução de cloreto de sódio 10% ( $\text{NaCl}$ ), resultando na solução aquosa básica III (SAB III) que, posteriormente, foi desidratada com 5 g de sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), homogeneizada e deixada em repouso durante 2 horas. Após filtração, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo e no evaporador rotativo a  $57^\circ\text{C}$  o clorofórmio foi evaporado, obtendo-se o extrato clorofórmico básico (ECB).

Para a quantificação do rendimento de obtenção do ECB a partir do EEB, foi considerada a quantidade de 1150 g de EEB obtendo-se em torno de 17 g ECB seco, cujo rendimento de extração equivalente a 1,48%.

Para preparo do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA), utilizou-se uma balança analítica e separadamente em erlenmeyer o ECB foi pesado e solubilizado com clorofórmio, transferido para funil de decantação para lavagem com HCl 10% e obtenção da subfração aquosa ácida (APA), que foi pulverizada na mistura mineral das dietas experimentais.

Tabela 1. Alcalóides piperidínicos identificados a partir de extrato de vagens de *Prosopis juliflora*

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular
Juliprosinina	$\text{C}_{40}\text{H}_{72}\text{N}_3\text{O}_2$	626,49
Juliprosopina	$\text{C}_{40}\text{H}_{76}\text{N}_3\text{O}_2$	630,48
Prosopina	$\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{NO}_3$	316,26

### 2.3 Animais, dietas e delineamento experimental

As avaliações de desempenho e estimativas da produção de gases de vacas lactantes ocorreram no Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, do Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB), da EMBRAPA Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil (latitude:  $21^\circ 35' 16''$  S; longitude:  $43^\circ 15' 46''$  W; altitude: 484 m) no período de fevereiro a maio de 2019.

Foram utilizadas quatro vacas primíparas da raça Holandesa e quatro multíparas Girolando (3/4 Holandesa x 1/4 Gir), com peso corporal médio de  $576,5 \pm 70$  kg, no terço médio da lactação, com produção de leite média de 20 kg/dia. As vacas foram distribuídas em dois quadrados latinos balanceados (4 x 4), em um período experimental de 84 dias, divididos em 4 períodos de 21 dias, com 15 dias de adaptação e 6 para coleta de dados.

As dietas experimentais consistiram em: dieta padrão sem aditivo; dieta com APA 5; 10 e 15 mg/kg MS). As dietas foram formuladas com base nas recomendações do NRC

(2001), para atender manutenção e produção média de 20 kg de leite/dia. As dietas foram compostas por concentrado (milho moído, farelo de soja, caroço de algodão, mistura mineral) e silagem de milho na respectiva proporção de 41,4:58,6, sendo a proporção expressa na base da MS (Tabela1).

Tabela 2 - Composição e perfil de ácidos graxos da ração mista total (RMT)

Ingrediente	RMT (MS g/kg MN)	RMT (g/kg MS)
Silagem de milho	310,81	585
Farelo de soja	887,8	111
Caroço de algodão	909,4	115
Milho moído	878,4	107
Mistura mineral*	928,2	82
Nutriente	g/kg MS	
Matéria orgânica	921,4	
Proteína bruta	160,0	
Extrato etéreo	58,5	
Matéria mineral	78,6	
Fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína	305,3	
Fibra em detergente ácido	239,5	
Carboidratos não fibrosos	463,4	
Carboidratos totais	702,9	
EB (Mcal/kg)	4,42	
Σ de ácidos graxos (saturados e insaturados)	g/100g	
C16	24,15	
C17	0,57	
C18	72,31	
C20	1,82	
C22	0,21	
C24	0,77	

C16 = (C16:0 + C16:1); \*Mistura mineral para vacas leiteiras - Composição (mínimo): Ca: 190 g/kg; P: 60 g/kg; Na: 70 g/kg; Mg: 20 g/kg; Co: 15 mg/kg; Cu: 700 mg/kg; Mn: 1.600 mg/kg; Se: 19 mg/kg; Zn: 2.500 mg/kg e I:40 mg/kg

As vacas foram alojadas em galpão tipo *free stall* climatizado com ventiladores, aspersores, provido de sistema eletrônico de monitoramento de ingestão individual de alimento (AF-1000 Master Gate, Intergado Ltda., Contagem, MG, Brasil), bebedouro coletivo com capacidade de 45 L de água e balança para pesagem corporal automática (WD-1000, Intergado Ltda., Contagem, MG). Cada animal recebeu na orelha direita um transponder passivo (FDX - ISO 11784/11785, Allflex, Joinville, SC, Brasil), para identificação eletrônica e abertura do portão do respectivo cocho. Foi utilizado o piso de borracha (WINGFLEX, Kraiburg, Tittmoning, Alemanha) forrado com maravalha, a qual era substituída diariamente. Foi utilizado o sistema de limpeza de pista por scraper (ACD 70-100-120c-180, DeLaval Ltd., Hamilton, 3241, New Zealand).

O acesso à água e dietas foi *ad libitum*, o fornecimento das dietas na forma de mistura total ocorria nos horários após ordenha 8h30 (60%) e 15h30 (40%) com controle da quantidade ofertada para assegurar sobras de 5 a 10%.

## 2.4 Síntese de proteína microbiana

Do 18º ao 19º dia de cada período experimental, foram realizadas coletas spot de urina por meio de micção estimulada por massagem na vulva, 4 h após o fornecimento da alimentação da manhã, de modo que foram 6 horários pontuais de coleta (4, 8, 12, 16, 20 e 24 h) conforme metodologia de (Lee; Morris; Dieter, 2019).

As amostras foram filtradas em gaze e uma alíquota de 10 ml foi separada e diluída em 40 ml de ácido sulfúrico (0,018 M), armazenadas a -20°C para as posteriores análises para a quantificação das concentrações de nitrogênio total, creatinina, alantoína e ácido úrico.

No Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (LAFa/UESB), foram determinadas as concentrações de creatinina, alantoína e ácido úrico, utilizando-se kits comerciais (Bioclin®), utilizando espectrofotometria conforme metodologias propostas por (Chen & Gomes, 1992).

A excreção de creatinina (mg/kg PC), utilizada para estimar o volume urinário e por intermédio das amostras spot foi obtida para cada animal, conforme equação sugerida por Chizzotti (2006).

$$EC = 32,27 - 0,01093 \times PC$$

**EC** = excreção diária de creatinina (mg/kg PC)

**PC** = peso corporal (kg)

O volume urinário foi estimado dividindo-se a excreção diária de creatinina (mg/kg PC) e concentração média de creatinina (mg/L) na urina spot, multiplicando-se pelo respectivo PC do animal.

Para estimativa da excreção de derivados de purina totais (DPT), foram somadas as quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina e alantoína no leite. A quantidade de purinas microbianas absorvidas (mmol/dia) foi estimada a partir da excreção de DP (mmol/dia), segundo equação de Verbic et al. (1990):

$$PA = (DPT - 0,385 \times PC^{0,75}) / 0,85$$

**PA** = purinas absorvidas (mmol/dia)

**DPT** = derivados de purinas totais (mmol/dia)

**0,85** = recuperação de purinas absorvidas como DP na urina

**0,385** = excreção endógena de DP na urina (mmol) por unidade de tamanho metabólico

O fluxo intestinal de nitrogênio microbiano (g NM/dia) foi estimado a partir da quantidade de purinas absorvidas (mmol/dia), segundo a equação de Chen & Gomes (1992):

$$\text{NM (g/dia)} = (70 \times \text{PA}) / (0,83 \times 0,116 \times 1000).$$

**70** = conteúdo de nitrogênio nas purinas (mg/mmol)

**0,83** = para a digestibilidade intestinal das purinas microbianas

**0,116** = relação N-purina: N-total nas bactérias

## 2.5 Parâmetros ruminais

No último dia de cada período experimental, 4 h após alimentação matinal foram realizadas coletas de líquido ruminal, com auxílio de bomba à vácuo acoplada a uma mangueira para à determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

O material coletado foi filtrado em camadas de gaze a fim de se obter 100 ml de líquido ruminal, em sequência, foi determinado o pH utilizando um potenciômetro digital. Imediatamente, o conteúdo ruminal foi dividido em duas partes de 50 ml em tubos Falcon<sup>®</sup> que foram congelados a -20°C. Ressalta-se que, na alíquota utilizada para as análises de AGCC foi adicionado 1 ml de solução de ácido metafosfórico a 20% e a segunda alíquota foi acidificada com uma solução de ácido sulfúrico, a 50%, para determinação de N-NH<sub>3</sub>, a qual foi realizada no Laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de leite pelo método Kjeldahl (AOAC, 1990).

Para a determinação de AGCC, aproximadamente 10 ml do líquido ruminal foi centrifugado por 15 min a 5000 x g, em seguida com uso de micropipeta foram coletados 2 ml do sobrenadante que foi congelado para posteriores análises.

A determinação e quantificação dos AGCC (acetato, propionato, butirato, valérico, isobutirato e isovalerato) utilizou-se o cromatógrafo líquido-gasoso (Hewlett Packard 5890 Series II GC, coluna empacotada cabopack, 3 m), com temperatura do forno de 120°C, equipado com integrador (Hewlett Packard 3396 Series II Integrator) e injetor automático (Hewlett Packard 6890 Series Injector) à temperatura de 106°C, e detector tipo FID a 190°C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio, sem rampa de aquecimento. O padrão interno utilizado foi o ácido 2-metilbutírico, sendo acrescentados, em cada tubo para leitura em cromatógrafo, 100µL do padrão interno, 800µL da amostra e 200µL de ácido fórmico. Uma mistura de ácidos graxos voláteis com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do integrador (Campos et al., 2004).

## 2.6 Perfil de ácidos graxos no leite

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (7:30 h e 15:30 h) em ordenhadeira mecanizada (DeLaval, Tumba, Suécia), tipo espinha de peixe (2x4) de circuito fechado com linha baixa equipada com medidores de leite eletrônicos MM27, controles MPC 580/680 e removedor automático de coletores (ACR).

No 18º dia, foram coletadas amostras individuais de leite nas duas ordenhas, em frascos identificados e sem conservante, que foram armazenadas a -20°C, para posterior determinação do perfil de ácidos graxos (AG). As análises foram feitas no laboratório de Cromatografia da Embrapa gado de leite.

Para a análise do perfil de AG, as amostras de leite foram descongeladas à temperatura ambiente, um volume de 1 ml foi usado para extração lipídica usando uma mistura de éter dietílico e hexano de acordo com o procedimento padronizado pela (AOAC, 1995).

A fase orgânica contendo a gordura do leite (aproximadamente 20 mg) foi desidratada a 40 °C sob N. livre de oxigênio. Os ésteres metílicos dos AG (FAME) foram obtidos via transesterificação catalisada por base, utilizando uma solução de metóxido de sódio recém preparada, conforme metodologia de (Baldin et al., 2013).

Os FAME foram separados e quantificados através de cromatógrafo gasoso (modelo 7820-A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com um detector de ionização de chama e equipado com uma coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (100 m × Espessura do filme de 0,25 mm × 0,2 µm; Varian Inc.). As condições operacionais são descritas por Cruz-Hernandez et al. (2007).

Os FAME foram identificados por referência cruzada com tempos de retenção dos padrões do FAME [mistura Supelco-37 FAME, mistura de isômeros de ácido linoléico e linolênico (Sigma – Aldrich®), Luta-CLA 60 (BASF) e BR2, BR3 e BR4 ramificados FAME (Larodan)] e isômeros trans/cis C18: 1 menores foram identificados de acordo com a ordem de eluição relatada nas mesmas condições analíticas para cromatografia em fase gasosa (Cruz-Hernandez et al., 2007).

## 2.7 Respirometria

Do 16º ao 21º dia de cada período experimental, ocorreram as mensurações realizadas nas câmaras respirométricas, para a determinação da produção de dióxido de

carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>), produção de calor (Pcal) e do consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>). Foram utilizadas quatro câmaras respirométricas de circuito aberto, conforme as especificações e procedimentos descritos por Machado et al. (2016) e Rodríguez et al. (2007).

Foram utilizadas 2 câmaras respirométricas confeccionadas em aço e janelas de acrílico, as quais permitem a visualização do animal e do interior da câmara. As câmaras possuíam duas aberturas opostas e volume interno de 22.391 L.

Diariamente, antes do início da mensuração das trocas gasosas do animal, foi realizada a calibração dos analisadores (Sable) de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>, utilizando-se gases de concentrações conhecidas, contidos em cilindros (CO<sub>2</sub> 5%; CH<sub>4</sub> 1% e N<sub>2</sub>) e o ar externo (O<sub>2</sub> 20,94%), sendo o N<sub>2</sub> o primeiro gás a ser liberado para limpeza das tubulações.

Esse processo consiste em ajustar a leitura do analisador ao final de cada período de 5 min, para os intervalos de concentração permitidos para cada gás que é de acordo a concentração indicada no cilindro. A calibração do O<sub>2</sub>, que é um gás mais estável, foi feita a cada 15 dias. O equipamento só foi considerado calibrado após três rodadas (cada rodada corresponde aos quatro ciclos de 5 min necessários para cada um dos gases – N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e O<sub>2</sub>).

## **2.8 Manejo dos animais na câmara respirométrica**

As vacas foram pesadas após a primeira ordenha do dia e alojadas no interior das câmaras, cujo fluxo de ar foi ajustado no fluxômetro de massa de acordo ao seu peso corporal (PC). As portas eram fechadas para estabilização dos gases no ambiente interno das câmaras. Após 20 minutos, a dieta era colocada nos cochos e as medições iniciadas. A mensuração foi realizada por 2 períodos consecutivos de 20-22h, os quais eram interrompidos para realização da ordenha, coleta de leite e limpeza das câmaras antes do retorno dos animais.

Cada período avaliado foi corrigido para o fator de correção da câmara utilizada e extrapolou-se a produção de gases no período para 24 h. As câmaras foram mantidas em condições de termoneutralidade, correspondendo à temperatura em torno de  $23 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade relativa do ar de  $65 \pm 5\%$ .

Uma vez que, animais que apresentaram consumo da dieta muito diferente do previsto e refletiram em grandes variações nos parâmetros em avaliação, estes foram novamente submetidos à nova mensuração.



Os resultados das concentrações dos gases e fluxo de ar foram, automaticamente, registrados por um software específico (ExpeData), que por diferença entre a composição do ar que entrou na câmara e do que saiu, quantificou o volume (L) de O<sub>2</sub> consumido e de CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> produzidos pelos animais. E estes foram usados para cálculo da produção de calor realizado de acordo com a equação de Brouwer (1965).

$$H \text{ (kJ)} = 16,18 \times O_2 \text{ (L)} + 5,02 \times CO_2 \text{ (L)} - 5,88 \times Nu \text{ (g)} - 2,17 \times CH_4 \text{ (L)}$$

**H** = produção de calor

**Nu** = nitrogênio urinário

Para a transformação dos dados em calorias, utilizou-se como referência o valor de 1 joule correspondente a 0,239 calorias conforme Brouwer (1965).

O coeficiente respiratório (CR) foi calculado pela razão entre CO<sub>2</sub> produzido (L) e O<sub>2</sub> consumido (L).

## 2.9 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo programa SAS (Version 9.1), por meio do procedimento MIXED considerando um modelo total. Na análise das médias das variáveis dependentes em função dos níveis de inclusão de APA (0; 5; 10 e 15 mg) utilizou-se contrastes polinomiais (L e Q).

Adotou-se como nível de significância 5% de probabilidade. Para as variáveis dependentes, cujos contrastes polinomiais foram significativos, foi realizada a análise de regressão dos efeitos de ordem linear (L) e quadrático (Q), em função dos níveis de APA, conforme modelo estatístico:

$$y_{ij}(k)m = \mu + SQm + ROW(SQ)im + COL(SQ)jm + \tau(k) + \varepsilon_{ij}(k)m \quad i, j, k = 1, \dots, r; m = 1, \dots, b$$

Onde:

$y_{ij}(k)m$  = observação  $ij(k)m$

$\mu$  = a média geral

$SQm$  = o efeito do m quadrado

$LINHA(SQ)im$  = o efeito da linha i dentro do quadrado m

$COL(SQ)jm$ , = o efeito da coluna j dentro do quadrado m

$\tau(k)$  = o efeito do tratamento k

$\varepsilon_{ij}(k)m$  = erro aleatório com média 0 e variância  $\sigma^2$

$r$  = o número de tratamentos, e o número de linhas e colunas dentro de cada quadrado

$b$  = o número de quadrados.

### 3. RESULTADOS

Os níveis de APA nas dietas experimentais não alteraram ( $P > 0,05$ ) a ingestão de MS, MO, FDNcp, CNF e EE expressos em (kg/PC<sup>0,75</sup>). Também não houve efeito ( $P > 0,05$ ) para o pH e concentração de nitrogênio amoniacal (NH<sub>3</sub>) do rúmen, concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), bem como para a proporção e somatório dos AGCC (Tabela 3).

Tabela 3 - Consumo, potencial hidrogeniônico (pH), concentrações de N-amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0vs5	5vs10+15	L	Q
	Consumo (kg/PC <sup>0,75</sup> )								
MS	151,53	168,71	167,37	161,62	4,43	0,221	0,151	0,528	0,197
MO	139,50	155,33	154,12	148,73	4,07	0,133	0,638	0,394	0,151
FDNcp	45,66	50,82	51,07	49,32	1,36	0,115	0,806	0,252	0,132
CNF	60,30	66,99	65,81	63,49	1,75	0,157	0,539	0,545	0,175
EE	9,00	10,24	10,13	9,68	0,27	0,093	0,555	0,365	0,102
	Parâmetros ruminais								
pH	7,18	7,13	7,25	7,14	0,06	0,749	0,616	0,995	0,753
N-NH <sub>3</sub> (mg/dl)	5,33	6,03	6,12	5,68	0,36	0,392	0,851	0,657	0,327
	Concentração de AGCC (mmol/l)								
Acetato	31,38	32,47	32,20	35,54	1,90	0,765	0,658	0,298	0,664
Propionato	10,41	11,27	9,39	11,55	0,74	0,639	0,614	0,791	0,619
Butirato	5,55	6,06	5,06	5,87	0,34	0,440	0,300	0,981	0,300
Isobutirato	0,46	0,49	0,47	0,50	0,02	0,725	0,911	0,754	0,981
Valerato	1,01	1,04	0,98	1,09	0,03	0,691	0,944	0,422	0,397
Isovalerato	1,54	1,61	1,46	1,66	0,06	0,577	0,635	0,637	0,523
	Proporção e somatório de AGCC								
A:P	3,20	3,01	3,48	3,14	0,11	0,310	0,069	0,603	0,537
P:B	1,82	1,87	1,88	2,04	0,08	0,726	0,479	0,158	0,600
∑ - A:P:B	47,35	49,81	46,66	52,96	2,83	0,678	0,999	0,467	0,647
∑ - Ib:V: Iv	3,02	3,15	2,91	3,25	0,11	0,609	0,753	0,581	0,577

MS – matéria seca; MO – matéria orgânica; FDNcp - fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteínas; CNF – carboidratos não fibrosos; EE – extrato etéreo; pH - potencial hidrogeniônico; A - Acetato; P - Propionato; B - Butirato; V-Valérato; Ib - Isobutirato; Iv - Isovalerato.

Os diferentes níveis de inclusão de APA não alteraram ( $P > 0,05$ ) a excreção de derivados de purina na urina, síntese e eficiência de proteína microbiana (Tabela 4).

Tabela 4 - Derivados de Purina e eficiência de síntese microbiana em vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5vs10+15	L	Q
DP	309,0	390,0	372,1	320,3	21,7	0,226	0,443	0,937	0,164
PA	309,1	404,3	382,1	322,8	25,4	0,228	0,442	0,937	0,169
NM	224,7	293,9	277,8	234,7	18,5	0,228	0,442	0,937	0,169
PBM	1404,6	1837,2	1736,7	1467,1	115,8	0,228	0,442	0,937	0,169
EFM	128,5	159,8	151,9	123,1	11,6	0,389	0,476	0,831	0,247

DP (mmol) - Derivados de purina totais; PA (mmol/dia) - Purinas absorvidas; NM (g/dia) - Nitrogênio microbiano; PBM (g/dia) - Proteína bruta microbiana; EFM (g/kg NDT) - Eficiência microbiana.

A produção de leite em kg/dia corrigida para 3,5% de gordura foi influenciada e apresentou variação quadrática ( $P = 0,020$ ) com a inclusão de APA nas dietas (Tabela 5), estimando-se máxima produção de leite na concentração de APA 7,7 mg/kg. Quanto ao perfil de ácidos graxos (AG) presentes na gordura do leite houve alterações nos teores do C16:1+C17 e C16:1c9+C17 anteiso, com variações quadráticas ( $P = 0,040$  e  $0,046$ ) e pontos de máximos nas doses de APA 6,0 e 6,5 mg/kg, respectivamente.

Tabela 5 – Produção de leite e somatório ( $\Sigma$ ) de ácidos graxos presentes na gordura do leite em vacas alimentadas com dietas contendo níveis de APA.

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5vs10+15	L	Q
Produção de leite (kg/dia)									
LCG 3,5% <sup>1</sup>	20,89	22,68	22,46	21,22	0,59	0,046	0,259	0,770	0,020 <sup>5</sup>
$\Sigma$ AG g/100g									
<i>de novo</i> <sup>2</sup>	54,21	54,77	54,45	55,01	0,48	0,659	0,972	0,603	0,999
C16:1+C17 <sup>3</sup>	1,74	1,81	1,77	1,66	0,02	0,233	0,084	0,165	0,040 <sup>6</sup>
C16 total <sup>4</sup>	31,07	31,35	31,32	31,46	0,40	0,747	0,953	0,672	0,913
C16:1c9+C17	1,30	1,38	1,35	1,25	0,00	0,212	0,134	0,308	0,046 <sup>7</sup>
C18	41,15	40,47	40,86	40,26	0,47	0,586	0,930	0,566	0,964
C18c	22,35	22,45	22,29	21,46	0,33	0,896	0,378	0,237	0,380
C18t	3,04	2,90	2,96	2,99	0,08	0,358	0,583	0,826	0,433
C18ct	0,63	0,61	0,63	0,62	0,01	0,613	0,565	0,951	0,891

<sup>1</sup>LCG 3,5% – leite corrigido para 3,5% de gordura; <sup>2</sup>AG < 16C originam-se da síntese na glândula mamária; <sup>3</sup>(C16:1t9+C17:0iso - C16:1t12 - C16:1c9+C17:0anteiso); <sup>4</sup>C16 total pré-formados e extraídos do plasma; <sup>5</sup> $y=20,94+0,4699x-0,0303x^2$ ;  $R^2=0,9794$ ; <sup>6</sup> $y=1,742+0,0214x-0,0018x^2$ ;  $R^2=0,9934$ ; <sup>7</sup> $y=1,302+0,0234x-0,0018x^2$ ;  $R^2=0,9918$ .

Os níveis de APA nas dietas não alteraram ( $P > 0,05$ ) o consumo de oxigênio (4822,23 l/dia), produção de CO<sub>2</sub> (5449,40 l/dia), coeficiente respiratório (1,13), produção de calor (0,85 MJ/kgPC<sup>0,75</sup>) e gás metano (448,68 l/dia) em vacas lactantes (Tabela 6).

Tabela 6 – Consumo, trocas gasosas, quociente respiratório, produção de calor e produção de metano por vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.

Variáveis	Níveis de inclusão (mg/kg MS)				EPM	P			
	0	5	10	15		0 vs 5	5vs10+15	L	Q
Rendimento diário de CH <sub>4</sub>									
g/dia	302,76	298,21	324,58	302,18	7,73	0,689	0,821	0,705	0,788
g/kgPC <sup>0,75</sup>	2,51	2,53	2,65	2,55	0,05	0,255	0,464	0,854	0,293
g/kg leite	15,50	13,53	15,59	14,43	0,43	0,063	0,103	0,716	0,571
Rendimento diário de CH <sub>4</sub> (g) / nutrientes ingeridos (kg)									
MS	16,24	14,63	16,85	16,81	0,40	0,135	0,024	0,240	0,293
MO	17,63	15,88	18,29	18,23	0,43	0,132	0,024	0,246	0,292
FDNcp	52,26	47,41	55,33	54,90	1,26	0,131	0,010	0,120	0,319
CNF	61,48	51,61	59,08	64,73	2,55	0,117	0,063	0,373	0,084
Rendimento diário de CH <sub>4</sub> (g) /nutrientes digestíveis (kg)									
MS	30,57	26,83	31,84	30,20	0,76	0,082	0,029	0,548	0,469
MO	31,05	28,02	32,93	31,39	0,77	0,154	0,031	0,366	0,609
FDNcp	142,02	128,91	160,30	139,62	4,19	0,264	0,048	0,509	0,643
CNF	89,81	73,68	89,60	96,25	3,51	0,073	0,018	0,204	0,074

CH<sub>4</sub> – metano entérico; MS - matéria seca; FDNcp - fibra em detergente neutro; MO – matéria orgânica; CNF – carboidratos não fibrosos.

A emissão diária de metano (g/dia; g/kgPC<sup>0,75</sup> e g/kg de leite), assim como, o rendimento diário de metano por consumo e fração digestível de MS, MO, FDN e CNF, bem como para produção diária de leite e peso metabólico não foram influenciados (P > 0,05) pelos níveis de APA nas dietas (Tabela 7). Entretanto, a dose de 5 mg/kg comparada com as doses de 10 e 15 mg/kg mostrou menor rendimento de CH<sub>4</sub> (g/dia) por nutrientes ingeridos (kg/dia), bem como para a fração digestível dos mesmos na dieta.

Tabela 7 - Produção e rendimento de metano por vacas lactantes alimentadas com dietas contendo níveis de APA.

Item	APA (mg/kg MS)				EPM	Valor de P			
	0	5	10	15		0vs5	5vs10+15	L	Q
Trocias gasosas (l/dia)									
O <sub>2</sub>	4878,60	4767,10	4930,16	4713,06	100,47	0,689	0,821	0,705	0,788
CO <sub>2</sub>	5523,5	5377,42	5591,95	5304,76	109,32	0,591	0,762	0,607	0,713
Produção de CO <sub>2</sub> /consumo de O <sub>2</sub>									
QR	1,14	1,13	1,13	1,14	0,00	0,255	0,464	0,854	0,293
Produção de calor (MJ/kgPC <sup>0,75</sup> )									
PC	0,87	0,83	0,87	0,85	0,01	0,281	0,354	0,848	0,708
Produção de CH <sub>4</sub> (l/dia)									
CH <sub>4</sub>	423,85	417,50	454,40	499,00	10,83	0,726	0,190	0,550	0,338

O<sub>2</sub> - oxigênio; CO<sub>2</sub> - dióxido de carbono; CR - coeficiente respiratório; PC- Produção de calor; CH<sub>4</sub> - Metano.

#### 4. DISCUSSÃO

Independentemente das doses, o extrato de alcaloides piperídínicos de algaroba (APA) associado à uma dieta com a mesma composição em ingredientes assegurou o consumo voluntário de MS, MO, FDNcp, CNF e EE pelos animais. Adicionalmente, em

associação aos referidos fatores, a similaridade para o tempo de adaptação dos animais e o horário de fornecimento das dietas experimentais na forma de mistura total e, também, para o tempo de coleta do líquido ruminal foram determinantes para obtenção de valores semelhantes de pH, de concentrações e proporções molares dos AGCC, bem como de N-NH<sub>3</sub> no rúmen.

Os valores de pH encontrados no presente estudo foram satisfatórios, pois estão acima do valor mínimo de 6,2 preconizado pela literatura para assegurar o desenvolvimento das bactérias fibrolíticas. Esses valores de pH estão próximos daqueles encontrados em estudos *in vitro* de Pereira et al. (2017), utilizando extrato de alcaloides piperidínicos de algaroba, após 12 horas de incubação variando entre 6,5 a 7,0 para os substratos farelo de trigo e feno de Tifton 85.

Em estudos com metabólicos fitogênicos é importante ressaltar que o potencial de ação dessas substâncias pode estar relacionado ao pH do rúmen, dado que, dependendo do pH encontrado, as moléculas ativas dos produtos naturais podem estar em seu estado dissociado (hidrofílico) ou não dissociado (hidrofóbico) (Cardozo et al., 2005).

Em pH menor as moléculas dos alcaloides piperidínicos ficam na forma hidrofílica tornando-se capazes de interagir nos sítios das membranas celulares nas quais se encontram os canais catiônicos das bactérias gram-positivas e desempenha efeito antimicrobiano (Choudhary et al., 2005; Pereira et al., 2017). Adicionalmente, Patra & Saxena (2010) reportaram que além do pH, a dieta na qual são adicionados, bem como os métodos adotados para preparação e extração atuam nas respostas de uso dos metabólitos secundários de plantas (MSP).

No entanto, é importante ressaltar que não houve efeito negativo do APA sobre o perfil da fermentação ruminal, pois, os resultados foram similares aos animais alimentados com dieta controle. Tanto que, as concentrações molares de AGCC predominantes no líquido ruminal permaneceram entre as faixas esperadas, de 54 a 74% de acetato; 16 a 27% de propionato e 6 a 15% conforme (Coelho da Silva & Leão, 1979). Os resultados encontrados estão de acordo com outros estudos com aditivos convencionais e alternativos (fitogênicos) fornecidos a ruminantes.

A similaridade no consumo de MS pode ter assegurado a manutenção na taxa de passagem e refletido na semelhança das respostas de produção microbiana. A Eficiência microbiana apresentou média de 140,8 g/kg de NDT, valor superior a 130 g para cada kg de NDT consumido conforme estabelecido pelo NRC (2001).

A síntese de proteína microbiana é dependente da disponibilidade e mudança no fornecimento de carboidratos, nitrogênio e presença de aditivos como os ionóforos (González-Ronquillo et al., 2003; NRC, 2001; Pereira et al., 2007). Entretanto, os níveis do aditivo fitogênico utilizado no presente estudo não foram suficientes para alterarem os parâmetros em questão.

Gehman et al. (2008) também não observaram efeito da monensina sobre a produção total de purinas e síntese de proteína microbiana em vacas leiteiras no terço médio de lactação, suplementadas com monensina 16 mg/kg MS. Os autores relataram valores 297,6 mmol/dia e 1.168 g/dia, para purinas totais e proteína microbiana respectivamente, os quais são inferiores aos verificados neste estudo.

A maior produção de leite com 3,5% de gordura foi observada para vacas que receberam 5 mg de APA o que pode estar associada ao melhor aproveitamento da energia da dieta, uma vez que, houve queda no rendimento de metano por nutrientes ingeridos e digeridos nas dietas com 5 mg de APA quando comparadas as dietas controle e/ou com maiores níveis de inclusão. Rico et al. (2016), verificaram maior produção de leite com 3,5% de gordura para vacas alimentadas com dietas contendo caroço de algodão e suplementadas com 1,5% na MS de C16:0. Desse modo, é possível sugerir que o APA favoreceu a produção de leite no presente estudo, uma vez que, a inclusão do caroço de algodão, tal qual, o teor de C16:0 não variaram na dieta experimental.

Ácidos graxos de cadeia curta e média são resultantes da síntese *de novo* na glândula mamária, responsável por 100% dos AG C4:0 a C12:0, aproximadamente 95% do C14:0 e 50% do C16:0 secretados no leite (Shingfield et al., 2013). Dessarte, a semelhança na fermentação ruminal dos carboidratos fibrosos das dietas, e, por conseguinte, nas concentrações de acetato podem ter ocasionado a manutenção na síntese *de novo* de AG na glândula mamária.

Importante destacar que o teor do ácido palmítico (C16:0), principal AG de cadeia média da gordura do leite e um dos mais peculiares dentre os AGS, apresentou média de 31,3 g/100g e não foi favorecido com o APA na dieta. O C16:0 tem sido associado a doenças coronarianas, como a arteriosclerose, ao favorecer o aumento da concentração das lipoproteínas de baixa densidade (Santos et al., 2013).

Possivelmente, o APA pode ter atuado sobre a atividade da  $\Delta^9$ -dessaturase que é responsável pela síntese do C16:1 $cis9$  na glândula mamária, ou favoreceu a biohidrogenação incompleta desse AG, aumentando a concentração do mesmo em 5,8% no nível de 6,2 mg/kg quando comparado a dieta sem aditivo. De acordo com Malau-

Aduli et al. (1997), a  $\Delta^9$ -dessaturase é responsável pela conversão de ácidos graxos saturados em monoinsaturados.

Para a coeluição (C16:1c9 + C17:0), o APA pode ter atuado sobre o metabolismo microbiano ruminal que refletiu na síntese do C17:0. Segundo Vlaeminck et al. (2006), a maioria dos AG de cadeia ímpar e ramificada presentes no leite são provenientes da síntese *de novo*, incorporados na membrana celular das bactérias ruminais.

No terço médio da lactação, a maior proporção dos ácidos graxos do leite são derivados da síntese *de novo* na glândula mamária, na qual a principal via metabólica envolve as enzimas acetil-CoA carboxilase, que dependem de precursores como o acetato resultante da fermentação ruminal (Shingfield et al., 2013), o qual não foi alterado no presente estudo.

Com a manutenção da maioria dos isômeros do ácido octadecenoico de configurações *cis*, *trans* e *cis-trans*, é possível sugerir que o APA não afetou a rota de biohidrogenação envolvendo o isômeros C18. De acordo Moallem (2009), o acúmulo de C18:1 *trans* no leite é reflexo da biohidrogenação incompleta dos ácidos graxos no rúmen. Nesse sentido, Lourenço et al. (2008) mostraram que alguns compostos de óleo essencial, como cinamaldeído (fenol 3-fenil-2-propenal; C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O) promoveu uma mudança da via principal de biohidrogenação a uma via secundária de biohidrogenação de C18: 2.

Para a obtenção de energia durante os processos metabólicos ocorre consumo de O<sub>2</sub> com produção de CO<sub>2</sub>, sendo que essa relação é expressa pelo coeficiente respiratório (CR) (Chwalibog, 2004). Este valor é uma referência ao substrato metabólico utilizado, sendo que, valores de CR próximo a 1,0 seriam para carboidratos, 0,8 para proteína e 0,7 para gorduras (Kleiber, 1972).

Os CR observados no presente experimento variaram de 1,13 a 1,14. Semelhantemente, Olijhoek et al. (2019), ao pesquisarem o potencial de aditivos fitogênicos (orégano com baixa concentração de óleos essenciais) para vacas em lactação não encontraram alteração no consumo de O<sub>2</sub> e produção de CO<sub>2</sub>.

A inalteração para produção de calor (PC) pode ser reflexo dos resultados semelhantes para excreção de nitrogênio urinário e consumo de O<sub>2</sub>. São parâmetros que apresentam extrema relevância nos cálculos de PC. Entretanto, a ausência de influência de APA sobre o consumo de O<sub>2</sub> e PC estão de acordo com os resultados encontrados por Sousa et al. (2022) ao fornecerem dietas aditivadas com 6,6 a 27,8 mg/kg para ovinos, o que foi justificado pela semelhança na ingestão de MS. Segundo os mesmos autores,

diferentemente do presente estudo a produção de CO<sub>2</sub> e QR foram alterados com a presença do APA.

A produção de calor dos animais alimentados inclui tanto o calor produzido nos processos de manutenção do organismo, bem como, o incremento calórico. Nesse trabalho, foi encontrado para produção de calor o valor médio de 0,85 (MJ/kgPC<sup>0,75</sup>), enquanto que, Kolling et al. (2018) relataram valor médio de 0,98 (MJ/kgPC<sup>0,75</sup>) em vacas lactantes alimentadas com dietas com proporção 60:40 volume e concentrado, consumo e produção semelhantes ao presente estudo.

Provavelmente, o nível de 5 mg/kg MS de APA atuou sobre as populações de *Archaeas* metanogênicas, visto que, a síntese de metano pode ser afetada por efeito seletivo através da inibição direta e/ou depressão dos processos metabólicos microbianos envolvidos na metanogênese (Bodas et al., 2012). De maneira que, houve menor rendimento diário de CH<sub>4</sub> por ingestão de nutrientes (kg/dia), da mesma maneira, para a fração digestível dos mesmos na dieta com 5 mg de APA.

Resultados positivos para redução de emissão de CH<sub>4</sub> foram relatados em estudos *in vitro* de Santos et al. (2013), com do uso do extrato clorofórmico básico de algaroba (ECB). Os autores destacaram o potencial do extrato fitogênico para ser usado como aditivo alimentar. Adicionalmente, Pereira et al. (2017) reportaram que no período de incubação de 12 e 24h, utilizando APA (7,9 µg e 12 µg) as médias de produção de CH<sub>4</sub> oriundas da fermentação do feno do Tifton 85 e farelo de trigo foram menores que a monensina (5µg).

Resultados, similarmente, consistentes ao presente estudo foram encontrados por (Sousa et al., 2022), ao avaliarem a produção de CH<sub>4</sub> em ovinos suplementados com dietas contendo diferentes níveis de APA (0; 6,6; 17,3 e 27,8 mg/kg MS). Os autores verificaram redução na produção de CH<sub>4</sub> g/dia, g/kg de MSI, FDNcp e kg/PC e atribuíram isso ao efeito do aditivo sobre a população microbiana responsável pela síntese desse gás.

Nesse sentido, Focant et al. (2019) observaram variação na produção de CH<sub>4</sub> em vacas leiteiras quanto ao tipo de metabólitos secundários de plantas, associação dos aditivos e variação nos ingredientes dietéticos.

Os resultados mostraram uma média diária de emissão de CH<sub>4</sub> de 306,9 g/dia com vacas de produção média de 21,2 kg/dia de leite que foram inferiores à observada em meta-análise sobre o efeito antimetanogênico da monensina realizada por Ranga Niroshan Appuhamy et al. (2013). A meta-análise foi composta por 11 estudos realizados em



condições de clima temperado, com vacas *Bos taurus*, com produção média diária de 20,5 kg de leite e emissões médias de 338 g/dia de CH<sub>4</sub>.

## **5 – CONCLUSÕES**

A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e o conteúdo de ácidos graxos C16:1 e C17:0 aumentam quando o APA foi adicionado a 5 mg/kg MS da ração. A dose da APA a 5 mg/kg mostra potencial para reduzir o rendimento de metano entérico.

## 6 – REFERÊNCIAS

AOAC - Association Official of Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 15th edition. **Association of Official Analytical Chemists**. Arlington, VA, 1990.

AOAC - Association Official of Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16th edition. **Association of Official Analytical Chemists**. Arlington, VA, 1995.

ARTAXO, P. Mudanças climáticas e o Brasil. **Revista USP**, [S. l.], DOI: 10.11606/issn.2316-9036.v0i103p8-12. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/revusp/article/view/99191>. n. 103, p. 8-12, 2014. Acesso em: 29 jan. 2022.

BALDIN, M. M. A. S.; GAMA, R.; DRESCH, K. J.; HARVATINE, AND D. E. OLIVEIRA. A rumen unprotected conjugated linoleic acid supplement inhibits milk fat synthesis and improves energy balance in lactating goats. **Journal Animal Science**. v. 91, p. 3305 - 3314, 2013.

BODAS, RN, PRIETO, NR, GARCÍA GONZÁLEZ, RS, ANDRÉS, S, GIRÁLDEZ, FJ, LÓPES, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and technology**, v.176, p. 78 - 93, 2012.

BRITO, E. F.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, H. G. O.; SOARES, A. C. M.; CORREIA, G. S.; SOUSA, L. B.; SOUZA, L. B.; SOARES, V. P. S.; DE PAULA, V. F. Effects of enriched mesquite piperidine alkaloid extract in diets with reduced crude protein concentration on the rumen microbial efficiency and performance in lambs. **Czech Journal of Animal Science**, v. 65, p. 268 - 280, 2020.

BROUWER, E. Report of Sub-Committee on Constants and Factors. Proc 3rd Symp. **On Energy Metabolism**, EAAP Publ. N° 11. p. 441 - 443, 1965.

CAMPOS, F.P.; NUSSIO, C.M.B.; NUSSIO, L.G. **Métodos de análises de alimentos**. Piracicaba: FEALQ, 2004. 135 p.

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, p. 2572 - 2579, 2005.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. Bucksburn: **Rowett Research Institute**, 1992. 21p.

CHIZZOTTI, M.L., VALADARES FILHO, S.C., VALADARES, R.F.D., CHIZZOTTI, F.H.M., CAMPOS, J.M.S., MARCONDES, M.I., FONSECA, M.A. Intake, digestibility

and urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.35, p.1813 - 1821, 2006.

CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; AZIM, M. K.; GHAYUR, M. N.; LODHI, M. A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B. M.; AHMAD, V. U. Juliflorine: a potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 332: 1171 - 1179, 2005.

CHOUDHARY, M.I.; NAWAZ, S.A.; ZAHEER-UL-HAQ, AZIM, M.K.; GHAYUR, H.N.; LODHY, M.A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B.H.; ATTA-UR-RAMAN, GILANI, A.H.; AHMAD, V.U. Juliflorine: a potente natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calciumchannel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, p. 1171 - 1179, 2005.

CHWALIBOG, A. Physiological basis of heat production – The fire of life. **Research School of Nutrition and Physiology**, 2004.

COBELLIS, G.; TRABALZA-MARINUCCI, M. C.; MARCOTULLIO, M.; YU, Z. Evaluation of different essential oils in modulating methane and ammonia production, rumen fermentation, and rumen bacteria in vitro. **Animal Feed Science and technology**. v. 215, p. 25 - 36, 2016.

COELHO DA SILVA, J. F. C.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380p.

CRUZ-HERNANDEZ, C., KRAMER, J.K.G., KENNELLY, J.J., GLIMM, D.R., SORENSEN, B.M., OKINE, E.K., GOONEWARDENE, L.A. AND WESELAKE, R.J. Evaluating the conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of Dairy Science**. v.90, p.3786, 2007.

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, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para análises de alimentos** - INCT – Ciência Animal. Editora UFV. 2012. 214p.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.308 - 316, 2000.

EFIMOVA, S. S.; ZAKHAROVA, A. A.; OSTROUMOVA, O. S. Alkaloids modulate the functioning of ion channels produced by antimicrobial agents via an influence on the lipid host. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 537, 2020.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Statistical database. **Fermentação entérica**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/es/#data/GE>>. Acesso: 26 fev. 2020.

FOCANT, M.; FROIDMONT, E.; ARCHAMBEAU, Q.; VAN, Q. D.; LARONDELLE, Y. The effect of oak tannin (*Quercus robur*) and hops (*Humulus lupulus*) on dietary

nitrogen efficiency, methane emission, and milk fatty acid composition of dairy cows fed a low-protein diet including linseed. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1144 - 1159, 2019.

GARCIA, W.R. **Processamento da soja grão e do caroço de algodão em dietas de vacas leiteiras**. 2005. 91f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 2005.

GEHMAN, A.; M.; KONONOFF, P. J.; MULLINS, C. R.; JANICEK, B. N. Evaluation of nitrogen utilization and the effects of monensin in dairy Cows fed brown midrib corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 288 - 300, 2008.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. **Tropical animal health and production**, v. 44, p. 729 - 739, 2012.

GONÇALVES, C. C. M.; BARCELOS, A. F. Fisiologia da Digestão dos Ruminantes. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 74, p. 25- 43, 2014.

GONZÁLEZ-ROQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1282 - 1291, 2003.

GRAINGER, C.; WILLIAMS, R.; CLARKE, T.; WRIGHT, A.D.; ECKARD, R.J. Supplementation with whole cottonseed causes long-term reduction of methane emissions from lactating dairy cows offered a forage and cereal grain diet. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2612 - 2619, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL (INPI), PEREIRA, M. L. A.; BATISTA, R. **Aditivo à base de extrato vegetal em rações, utilizado como modificador da fermentação ruminal para melhoria do desempenho animal e mitigação da emissão de gases entéricos de efeito estufa**. BR 10 2012 030155-5, 27, 2014.

JENKINS T. C. Lipid metabolism in the rumen. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism. **Journal of Dairy Science**. v.79, p.3851- 3863, 1993.

JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2483-2492, 1995.

KLEIBER, M. **Bioenergia animal**: El fuego de la vida. Editorial Acribia, Zaragoza, 1972, 428p.

KOLLING, G. J.; STIVANIN, S. C. B.; GABBI, A. M.; MACHADO, F. S.; FERREIRA, A. L.; CAMPOS, M. M.; TOMICH, T.R.; CUNHA, C. S. W.; DILL, S. W.; PEREIRA, L. G. R.; FISCHER, V. Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 4221 - 4234, 2018.

LEE, C.; MORRIS, D. L.; DIETER, P. A. Validating and optimizing spot sampling of urine to estimate urine output with creatinine as a marker in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 31, p. 22-32, 2018.

LÓPEZ, S., GARCÍA-GONZÁLEZ, R., FERNÁNDEZ, M., BODAS, R., GONZÁLEZ, J.S. Medicinal plants as feed additives in animal nutrition. **Natural Products**, v.15, p. 309 – 333, 2007.

LOURENÇO, M.; CARDOZO, P.W.; CALSAMIGLIA, S.; FIEVEZ, V. Effects of saponins, quercetin, eugenol, and cinnamaldehyde on fatty acid biohydrogenation of forage polyunsaturated fatty acids in dual-flow continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 3045 - 3053, 2008.

MACHADO, F.S.; TOMICH, T.R.; FERREIRA, A.L.; CAVALCANTI, L.F.L.; CAMPOS, M.M.; PAIVA, C.A.V.; RIBAS, M.N.; PEREIRA, L.G.R. Technical note: A facility for respiration measurements in cattle. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.4899-4906, 2016.

MALAU-ADULI, A. E. O.; SIEBERT, B. D.; BOTTEMA, C. D. K.; PITCHFORD, W. S. A comparison of the fatty acid composition of triacylglycerols in adipose tissue from Limousin and Jersey cattle. **Australian Journal of Agriculture Research**, Collingwood, v. 48, p. 715 - 722, 1997.

MOALLEM, U. The effects of extruded flaxseed supplementation to high-yielding dairy cows on milk production and milk fatty acid composition. **Animal Feed Science and Technology**, v.152, p.232 - 242, 2009.

MURRAY, R. M.; BRYANT, A M.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **The British journal of nutrition**, v. 36, p. 1–14, 1976.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Washington, DC. National Academy Science, 408 p, 2001.

OLIJHOEK, D. W.; HELLWING, A. L. F.; GREVSEN, K., HAVEMAN, L. S.; CHOWDHURY, M. R.; LØVENDAHL, P.; LUND, P. Effect of dried oregano (*Origanum vulgare L.*) plant material in feed on methane production, rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk fatty acid composition in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 9902 - 9918, 2019.

OLIVEIRA, A. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H. G. O.; SILVA, E. R.; DUTRA, I. C.; CORREIA, G. S.; SOARES, V. P. S.; OLIVEIRA, K. P.; PORTO, M. R. Enriched Mesquite Piperidine Alkaloid Extract Improves the Performance in Growing Goats. **International Journal of Environmental and Agriculture Research**, v. 7, p. 77-90, 2021.

OTT-LONGONI, R., VISWANATHAN, N., HESSE, M. A estrutura do alcaloide juliprosopine da *Prosopis juliflora* A. DC. **Helv Chem Acta**. v. 63, p. 2119–2129, 1980.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1198 - 1222, 2010.

PEREIRA, K.P.; VERAS, A.S.C.V.; FERREIRA, M.A.; BATISTA, A.M.V.; MARQUES, K.A.; FOTIUS, A.C.A. Balanço de nitrogênio e perdas endógenas em bovinos e bubalinos alimentados com níveis crescentes de concentrado. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v. 29, p. 433 - 440, 2007.

PEREIRA, T. C. J.; PEREIRA, M. L. A.; MOREIRA, J. V.; AZEVÊDO, J.A.G.; BATISTA, R.; DE PAULA, V. F.; OLIVEIRA, B. S.; SANTOS, E. J. Effects of alkaloid extracts of mesquite pod on the products of in vitro rumen fermentation. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 24, p. 4301 - 4311, 2017.

RANGA NIROSHAN APPUHAMY. J. A. D.; STRATHE, A. B.; JAYASUNDARA, S.; WAGNER-RIDDLE, C.; DIJKSTRA, J.; FRANCE, J. AND KEBREAB, E. Anti-methanogenic effects of monensin in dairy and beef cattle: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 5161 – 5173, 2013.

RICO, J. E.; DE SOUZA, J.; ALLEN, M.S.; LOCK, A.L. Nutrient digestibility and milk production responses to increasing levels of palmitic acid supplementation vary in cows receiving diets with or without whole cottonseed. **Journal of animal science**, v.95, p. 436-446, 2016.

RODRÍGUEZ, N.M; CAMPOS, W.E.; LACHICA, M.L. BORGES, I.; GONÇALVES, L.C.; BORGES, A.L.C.C.; SALIBA, E.O.S. A calorimetry system for metabolismo trials. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 495 - 500, 2007.

RUFINO JUNIOR, J; CARVALHO, D.M.G; SOUZA, J.G.; CABRAL, L.S.; SILVA, J.J.; RIBEIRO, M.D.; ARNOLDO, T.L.Q.; OLIVEIRA, A.S.; SOARES, J.Q. Caroço de algodão em dietas sem volumoso para cordeiros confinados. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, p. 2727 - 2738, 2015.

SANTOS J. E. P.; VILLASEÑOR, M.; DEPETERS, E. J.; ROBINSON, P. H.; BALDWIN Jr, B. C. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows: effects on lactation performance and plasma gossypol. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p.1491 - 1501, 2002.

SANTOS, E. T.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, C. F. P. G.; SOUZA-NETA, L. C.; GERIS, R.; MARTINS, D.; SANTANA, A. E. G.; BOABOSA, L. C. A.; SILVA, H. G. O.; FREITAS, G. C.; FIGUEIREDO, M. P.; OLIVEIRA, F. F.; BATISTA, R. Antibacterial activity of the alkaloid-enriched extract from *Prosopis juliflora* pods and its influence on in vitro ruminal digestion. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 8496 - 8516, 2013.

SANTOS, J. R. A.; PEREIRA, M. L. A.; PEREIRA, T. C. J.; SILVA, H.G.O.; SANTOS, O. O.; CARVALHO, G. G. P.; ALMEIDA, J. R. F. A.; SILVA, R. P.; RIBAS, K. P. O. Supplementation with mesquite alkaloids extract in diets for lambs fed Bermuda grass improves growth performance. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106 - 560, 2021.

SANTOS, R. D., GAGLIARDI, A. C. M., XAVIER, H. T., MAGNONI, C. D., CASSANI, R., LOTTENBERG, A. M. P., ... & RAMOS, S. I. Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, p. 1-40, 2013.

SHINGFIELD, K. J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, v.7, p.132 - 162, 2013.

SHINGFIELD, K. J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, v.7, p.132 - 162, 2013.

SOUSA, L. B.; PEREIRA, M. L. A.; SILVA, H. G. O.; SOUSA, L. B.; SILVA, L. S.; MACHADO, F. S.; TOMICH, T. R.; OSS, D. B.; FERREIRA, A. L. CAMPOS, M. M.; COSTA, I. C.; PEREIRA, L. G. R. Prosopis juliflora piperidine alkaloid extract levels in diet for sheep change energy and nitrogen metabolism and affect enteric methane yield. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2022.

TANG, C. H.; LIU, J.; ZHAO, Q. Y.; ZHANG, J. M. Pharmacokinetic comparison of gossypol isomers in cattle: transfer from diet to plasma and degradation by rumen microbes. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B**. v. 19, p. 471- 480, 2018.

VANCEK M, VIDOVÁ M, MAJERNÍK AI AND SMIGÁN P. Methanogenesis is Ca<sup>2+</sup>dependent in *Methanothermobacter thermautotrophicus* strain ΔH. **FEMS Microbiol Lett** v. 258, p. 269 – 273, 2006.

VERBIC, J.; CHEN, X. B.; MACLEOD, N. A.; ØRSKOV, E. R. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, v. 114, p. 243 - 248, 1990.

VLAEMINCK, B., V. FIEVEZ, A. R. J. CABRITA, A. J. M. FONSECA & R. J. DEWHURST. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 389 - 417, 2006.