



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

**NÍVEIS DE INCLUSÃO DE ALCALOIDES
PIPERIDÍNICOS DE ALGAROBA EM DIETA PARA
OVINOS – AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL,
NUTRICIONAL E METABÓLICA**

Autor: Karine Pinheiro de Oliveira Ribas
Orientador: Prof. Dr. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Abril de 2019

KARINE PINHEIRO DE OLIVEIRA RIBAS

**NÍVEIS DE INCLUSÃO DE ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE
ALGAROBA EM DIETA PARA OVINOS – AVALIAÇÃO
COMPORTAMENTAL, NUTRICIONAL E METABÓLICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-orientador: Prof. Dr. Herymá Giovane de Oliveira Silva

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Abril de 2019

636.085 Ribas, Karine Pinheiro de Oliveira.

R365n Níveis de inclusão de alcaloides piperidínicos de algaroba em dieta para ovinos – avaliação comportamental, nutricional e metabólica. / Karine Pinheiro de Oliveira Ribas. - Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2019.
62fl.

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^ª. D. Sc. Mara Lúcia Albuquerque Pereira e coorientação do Prof. D.Sc. Herymá Giovane de Oliveira Silva.

1. Ovinos - Dieta – Algaroba - Alcaloides. 2. Ovinos – Aditivo fitogênico.
3. *Prosopis juliflora* - Aditivo fitogênico. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Silva, Herymá Giovane de Oliveira. IV. Título.

CDD(21): 636.085

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Ovinos - Dieta – Algaroba - Alcaloides
2. Ovinos – Aditivo fitogênico
3. *Prosopis juliflora* - Aditivo fitogênico

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

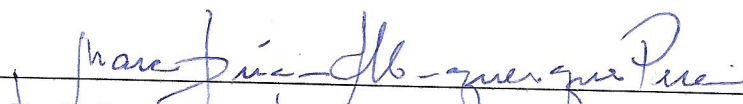
Título: "Níveis de inclusão de alcaloides piperidínicos de algaroba em dieta para ovinos - Avaliação comportamental, nutricional e metabólica".

Autor (a): Karine Pinheiro de Oliveira Ribas

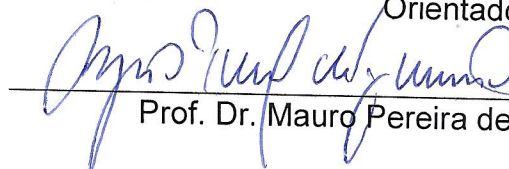
Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Co-orientador (a): Prof. Dr. Herymá Giovane de Oliveira Silva

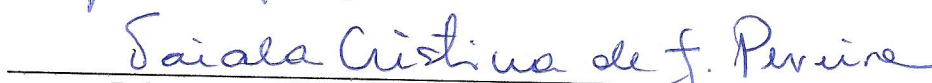
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM ZOOTECNIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PRODUÇÃO DE RUMINANTES, pela Banca Examinadora:



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



Prof. Dr. Mauro Pereira de Figueiredo – UESB



Dr^a. Taiala Cristina de Jesus Pereira - RNP/UFBA

Data de realização: 08 de abril de 2019.

“...Vós que tornais eloquente a língua das criancinhas, modelai a minha palavra e derramai nos meus lábios a graça de vossa bênção. Dai-me a penetração da inteligência, a faculdade de lembrar-me, o método e a facilidade do estudo, a profundidade na interpretação e uma graça abundante de expressão. Fortificai o meu estudo, dirigi o seu curso, aperfeiçoai o seu fim, Vós que sois verdadeiro Deus e verdadeiro homem, e que viveis nos séculos dos séculos, Amém! ”

São Tomás de Aquino

Aos

Meus pais,
por todo amor e esforço

Ao

Meu marido,
pelo apoio e pela paciência

Aos

Meus mestres,
pelo incentivo e disponibilidade

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder paciência e calma.

À Nossa Senhora, fiel intercessora por passar sempre à frente de tudo.

À Associação Nossa Senhora das Dores, por recarregar a bateria da alma. Muitos dias estive sem esperança e vivendo a missão encontrei Jesus Cristo nos pobres, por meio de sorrisos puros e abraços sinceros, apesar de tanto sofrimento e desigualdade. Aos servos das dores, toda a minha gratidão pelas orações incessantes e acolhimento.

Aos meus pais, Jidailde e Reginaldo, por lutarem essa batalha comigo. Sei que abdicaram muitos sonhos para que eu chegasse onde estou.

Ao meu marido, Gustavo Ribas, pelo amor, compreensão e porto seguro nos momentos de crise.

Ao meu vovô Expedito, pelo exemplo de humildade. Referência que carrego de lida no campo com pequenos produtores.

Aos meus familiares e familiares do meu esposo, que estiveram na torcida, em especial meus sogros, Cristine e Manoel.

À minha tia Adriana pelas orações e palavras desafiadoras que me proporcionaram coragem.

Às minhas amigas, Indiara e Janaína, por sofrerem as minhas dores e comemorar as vitórias, mesmo tão distantes.

Aos meus mestres, Mara Lúcia pela orientação com amor, paciência e dedicação, pois me fez amar a inconstância da pesquisa e César Augusto por me colocar no LAFA, pelas grandes gargalhadas e preocupação com meu futuro acadêmico. Realmente são os meus pais da UESB.

Ao professor Herymá Giovane, pela paciência infinita. Poucos possuem um co-orientador prontamente disponível e isso me faz perceber quanta dedicação põe em tudo aquilo que faz.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Animal (LAFA):

Às doutoras Alana Batista, Edileusa Santos e Taiala Pereira, meu primeiro pilar de aprendizado nesse “novo mundo” de pesquisa. Não consigo descrever quão importante foram as explicações nesse trajeto, a precisão nas análises e formas de escrita. Em muitas coisas tomei vocês como exemplo para minha postura diante as dificuldades do dia a dia. Aos colegas, Eliseu e George, pela disponibilidade quando precisei, pelas gargalhadas, caronas e companhia no LAFA. À Joane e Larisse pelo ombro amigo em meio a alegrias e tristezas que encontrei pelo percurso. Aos IC's, Cleiton, Hélio, Palas, Thamiris e Virgínia pela ajuda nas análises, por fazerem o ambiente de trabalho um verdadeiro lugar de bem-estar e me ensinarem bom convívio.

Saibam que durante esse tempo estive feliz, mesmo em meio ao cansaço.

À Josivânia, por conceder parte do trabalho.

À Weiber pela disponibilidade e aprendizado.

Aos mestres da casa (PPZ), Antônio, Cristiane Leal, Herymá Giovane, Fábio Teixeira, Lucas Teixeira, Luiz Gustavo, Mara Pereira, Mauro Figueiredo, Robério Silva, Paulo Bonomo e aos Pós-doc's Ana Paula e Daniel Lucas pelo ensino, bom senso e críticas que me levaram a pensar e escrever com outras percepções.

Aos meus colegas de mestrado, Abias, Bismark e Camile. Sei que, em meio ao caos, teremos sempre um ao outro para aprender, trocar artigos, rir e dividir tristezas.

Aos meus colegas de turma do mestrado, Carol, Jonas, Kássio, Lorena, Luiza, Márcia, Rebeka e Reginaldo pela troca de aprendizado.

Aos amigos do grupo “baile de favela”, Danrlei, Érick, Ingridy e Nadjane, que foram meu suporte em muitas análises, deixo aqui registrado a saudade desses dias e meu muito obrigada por todo, mas todo apoio mesmo.

Aos funcionários do módulo de laboratórios, Dona Fátima, Seu Gilberto, Tarcísio e tantos outros queridos que encontrei pelos corredores.

Às meninas da PPZ, Raquel e Roberta, por dividirem tempos preciosos comigo, como tomar um café e explicarem a papelada com tanta disponibilidade.

Aos funcionários do DTRA, Dany e Rabi por suportarem minhas idas e ligações constantes. Ainda bem que a placa de “entrada proibida” não foi efetivada, rs.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), por ter me possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal (LFA), por se tornar um aconchego, proporcionar tanto amadurecimento e experiência profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos.

A Fundação de Amparo e Pesquisa da Bahia (FAPESB) pela vigência de bolsa durante 24 meses.

Ao Programa de Pós-Graduação de Zootecnia (PPZ) pela experiência enriquecedora.

Aos que contribuíram de forma indireta ou que por algum motivo não citei, Deus abençoe!

BIOGRAFIA

Karine Pinheiro de Oliveira Ribas, filha de Jidailde Matos Pinheiro e Reginaldo Neves de Oliveira, nasceu em Santo Antônio de Jesus, no dia 06 de junho de 1992.

Em maio de 2016, concluiu o curso de Bacharel em Zootecnia, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus Juvino Oliveira*, Itapetinga – BA.

Em março de 2017, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção de Ruminantes, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, realizando estudos na área de metabolismo de pequenos ruminantes com ênfase em metodologia de coleta de urina.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
I – REFERENCIAL TEÓRICO	17
1. Introdução	17
1.1. Monensina e alcaloides piperidínicos de algaroba como antimicrobianos.....	20
1.2. Método de derivados de purina como marcadores de síntese de proteína microbiana.....	22
1.3. Referências.....	26
II – OBJETIVOS GERAIS	32
III - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
IV – CAPÍTULO I – COMPORTAMENTO INGESTIVO E PARÂMETROS NUTRICIONAIS EM OVINOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS DE ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE ALGAROBA	34
Resumo	34
Abstract	35
Introdução	36
Material e Métodos	38
Resultados e Discussão	45
Conclusão	53
Referências	54
V – CAPÍTULO II – CREATININA E TEMPOS DE COLETA DE URINA PARA ESTIMAR A EXCREÇÃO DE DERIVADOS DE PURINA EM OVINOS ALIMENTADOS COM ALCALOIDES PIPERIDINICOS DE ALGAROBA.....	58
Resumo	58
Abstract	59
Introdução	60
Material e Métodos	62
Resultados e Discussão	66

Conclusões	75
Referências	76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

	Página
TABELA 1. Proporção dos ingredientes da dieta e composição química do feno de Tifton 85 e concentrado.....	39
TABELA 2. Comportamento ingestivo em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).....	45
TABELA 3. Eficiência de alimentação (EAL) e de ruminação (ERU) em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).....	47
TABELA 4. Consumo de nutrientes e energia metabolizável (EM) em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)	48
TABELA 5. Digestibilidade de nutrientes em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).....	49
TABELA 6. Balanço de nitrogênio, síntese e eficiência microbiana em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).....	50

CAPÍTULO II

- TABELA 1. Proporção dos ingredientes da dieta e composição química do feno de Tifton 85 e concentrado..... 62
- TABELA 2. Média e erro padrão da média (EPM) em coleta de urina de 24 horas e concentração plasmática de creatinina em cordeiros alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)..... 66
- TABELA 3. Volume de urina, excreção de derivados de purina e índice DPC em amostras de coleta *spot* coletadas em intervalos de 4 horas após a alimentação matinal (T) e coleta de urina total de 24 h (U24) em cordeiros alimentados com dietas (D) contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) 69
- TABELA 4. Volume de urina, excreção de derivados de purina, excreção diária de creatinina e índice DPC em amostras de coleta total acumulativa, coletadas em intervalos de 4 horas após a alimentação matinal (T) e coleta de urina total de 24 h (U24) em cordeiros alimentados com dietas (D) contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)..... 70
- Concentrações de derivados de purina e creatinina utilizando amostras
- TABELA 5. de urina *spot* e total coletados em intervalos de 4 horas, após a alimentação matinal (T) e coleta de urina total de 24 h (U24) e em cordeiros alimentados com dietas (D) contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)..... 74

RESUMO

RIBAS, Karine Pinheiro de Oliveira. **Níveis de inclusão de alcaloides piperidínicos de algaroba em dieta para ovinos – avaliação comportamental, nutricional e metabólica.** Itapetinga, BA: UESB, 2019. 62p. Dissertação. (Mestrado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se avaliar os efeitos de dietas aditivadas com níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA: 0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg MS) em comparação com monensina (MON: 2,1 mg/kg MS) sobre o comportamento ingestivo e parâmetros nutricionais em ovinos (Capítulo I), depuração e excreção de creatinina, e avaliação de diferentes tempos de coletas (4, 8, 12, 16, 20 e 24 h após alimentação da manhã) de amostragens de coleta *spot* de urina e de urina total acumulativa em comparação com urina total de 24 h (U24) para estimar a excreção derivados de purina (DP) e razão de concentração de derivados de purina por creatinina (índice DPC) (Capítulo II). Utilizou-se 400 g de feno de Tifton 85 e 600 g de concentrado por kg de MS da dieta. O comportamento ingestivo foi avaliado em 30 cordeiros Dorper x Santa Inês, machos não castrados, com peso médio inicial de $17,50 \pm 0,43$ kg durante 4 períodos de coleta de dados, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 6 repetições durante 84 dias. Para avaliar o consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio, síntese microbiana no rúmen e as excreções urinárias de creatinina e de DP foram utilizados 5 cordeiros Dorper x Santa Inês, machos não castrados, confinados e peso médio inicial de $21,05 \pm 0,54$. O consumo de MS e de FDN não diferiram entre os aditivos e níveis de APA ($P > 0,05$). O tempo de ruminação e de mastigação de MS e de FDN, mastigações meréricas e tempo de mastigação por bolo apresentou resposta quadrática com ponto de mínimo em função de APA ($P < 0,05$). A eficiência de alimentação não foi afetada com o uso dos aditivos nas dietas ($P > 0,05$), mas a eficiência de ruminação para MS e FDN apresentou efeito quadrático com ponto de máximo ($P < 0,05$). Não houve efeito ($P > 0,05$) dos aditivos e nem dos níveis de APA sobre o consumo de PB, EE, NDT, CNF e EM. A Digestibilidade de PB apresentou efeito quadrático com ponto de máximo ($P < 0,05$). A excreção urinária de nitrogênio (N) não foi influenciada pela dieta ($P > 0,05$) e a excreção de N fecal e produção microbiana apresentou efeito quadrático com ponto de mínimo ($P < 0,05$). O volume urinário foi afetado de forma linear decrescente pelas dietas ($P < 0,05$), mas não diferiu entre MON e APA ($P > 0,05$). Não houve alterações na depuração de creatinina, excreção diária de creatinina e concentração de creatinina no plasma ($P > 0,05$). A excreção diária de DP e o índice DPC variaram de forma quadrática com pontos mínimos ($P < 0,05$). A excreção de DP utilizando as amostragens de coleta *spot* e total acumulativa estimada com o volume urinário observado (urina total 24 h) variou entre dietas e tempo de coleta ($P < 0,05$). A excreção diária de creatinina extrapolada pela urina total acumulativa e o volume de urina estimado utilizando o valor médio de 16,10 mg/kg PC, não variaram ($P > 0,05$) entre as dietas, tempo de coleta e a interação entre dieta x tempo não foi significativa. O volume urinário estimado não diferiu ($P > 0,05$) entre as dietas, tempo de coleta *spot* de urina e interação dieta x tempo ($P > 0,05$). O índice DPC para urina *spot* foi diferente entre dietas ($P < 0,05$), mas sem efeito de tempo e interação ($P > 0,05$). Não se constatou diferenças entre dietas para índice DPC para urina total acumulativa e interação entre dieta x tempo ($P > 0,05$) com efeito de tempo de duração de coleta ($P < 0,05$). Os níveis de APA apresentam efeito dose-dependente sobre a digestão ruminal sem afetar o consumo em ovinos, sendo que doses de 2,3 a 4,5 mg/kg

reduzem a perda de N fecal e aumentam a retenção de N, doses de 4,5 a 6,6 mg/kg reduzem a atividade de ruminação e a síntese microbiana e doses de 6,6 a 9,2 mg/kg aumentam a atividade de ruminação e a síntese microbiana. A creatinina não é afetada pelas doses utilizadas de APA e pode ser usada para estimar o volume urinário em urina *spot* coletadas nos pontos de tempo 4, 8 e 12 h após alimentação da manhã. Creatinina em amostras de urina total acumulativa não é adequada para estimar o volume urinário e para obter o índice DPC.

Palavras-chave: aditivo fitogênico, derivados de purina, métodos de coleta, *Prosopis juliflora*

* Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-orientador: Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

ABSTRACT

RIBAS, Karine Pinheiro de Oliveira. **Inclusion levels of algaroba piperidine alkaloids in sheep diet - behavioral, nutritional and metabolic evaluation.** Itapetinga, BA: UESB, 2019. 62p. Dissertation. (Master's Degree in Animal Science, Area of Concentration in Ruminant Production). *

The objective of this study was to evaluate the effects of diets with piperidine alkaloids (MPA: 0, 2.3, 4.6 and 9.2 mg/kg DM) compared to monensin (MON: 2.1 mg/kg DM) on ingestive behavior and nutritional parameters in sheep (Chapter I), creatinine clearance and excretion, and evaluation of different sampling times (4, 8, 12, 16, 20 and 24 h after morning feeding) of urine and total urine cumulative urine collection compared to 24-h total urine (U24) to estimate purine derivatives (PD) and purine derivatives ratio by creatinine (PDC index) (Chapter II). 400 g of Tifton 85 hay and 600 g of concentrate per kg of diet DM were used. The ingestive behavior was evaluated in thirty lambs Dorper x Santa Inês, uncastrated males, with average initial weight of 17.50 ± 0.43 kg during 4 periods of data collection, distributed in a completely randomized design with 5 treatments and 6 replications during 84 days. To evaluate the consumption, digestibility, nitrogen balance, microbial synthesis in the rumen and the urinary creatinine and PD excretions, 5 Dorper x Santa Inês lambs, uncastrated male, housed with average initial weight of 21.05 ± 0.54 . Consumption of DM and NDF did not differ between additives and MPA levels ($P > 0.05$). The rumination and chewing time of DM and NDF, merit chewing and chewing time per cake showed a quadratic relationship with a minimum point of MPA ($P < 0.05$). The feed efficiency was not affected by the use of the additives in the diets ($P > 0.05$), but the rumination efficiency for DM and NDF showed quadratic effect with maximum point ($P < 0.05$). There was no effect ($P > 0.05$) of the additives and neither of the MPA levels on CP, EE, TDN, FNC and DM. The digestibility of CP showed quadratic effect with maximum point ($P < 0.05$). The urinary excretion of nitrogen (N) was not influenced by the diet ($P > 0.05$) and the excretion of fecal N and microbial production showed a quadratic effect with a minimum point ($P < 0.05$). The urinary volume was affected linearly decreasing by the diets ($P < 0.05$), but did not differ between MON and MPA ($P > 0.05$). There were no changes in creatinine clearance, daily creatinine excretion and plasma creatinine concentration ($P > 0.05$). The daily excretion PD and PDC index varied in a quadratic way with minimum points ($P < 0.05$). The excretion of PD using *spot* sampling and cumulative total sampling with observed urine volume (total urine 24 h) differed between diets and collection time ($P < 0.05$). Daily excretion of creatinine extrapolated by cumulative total urine and estimated urine volume using the mean value of 16.10 mg/kg CP did not vary ($P > 0.05$) between diets, time of collection and interaction between diet x time was not significant. Estimated urinary volume did not differ ($P > 0.05$) between diets, urine *spot* collection time and diet x time interaction ($P > 0.05$). The PDC index for *spot* urine was different between diets ($P < 0.05$), but with no effect of time and interaction ($P > 0.05$). There were no differences between diets for PDC index for cumulative total urine and interaction between diet and time ($P > 0.05$) with effect of duration of collection ($P < 0.05$). MPA levels have a dose-dependent effect on ruminal digestion without affecting consumption in sheep, and doses of 2.3 to 4.5 mg/kg reduce fecal N loss and increase N retention, doses of 4.5 to 6.6 mg/kg reduced rumination activity and microbial synthesis and doses of 6.6 to 9.2 mg/kg

increased rumination activity and microbial synthesis. Creatinine is not affected by MPA doses and can be used to estimate urine volume in *spot* urine collected at time points 4, 8 and 12 h after morning feeding. Creatinine in cumulative total urine samples is not adequate to estimate urinary volume and to obtain the PDC index.

Key words: phytogenic additive, purine derivatives, collection methods, *Prosopis juliflora*

* Adsiver: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-adsiver: Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

I – REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A digestão de ruminantes é dependente da atividade de espécies microbianas e fatores físico-químicos ruminais, como temperatura e pH, que se inter-relacionam de forma complexa (Faniyi et al., 2019). Essa simbiose garante a hidrólise de nutrientes, uma vez que, não há secreção de enzimas digestivas no rúmen e subsequentemente, a fermentação destes fornecem produtos que constituem a principal fonte de energia e nitrogênio para o hospedeiro.

No ambiente ruminal, a proteína dietética é hidrolisada liberando aminoácidos para serem utilizados na síntese de proteína pelos microrganismos ruminais (Pmic), e uma vez em excesso os aminoácidos são desaminados e a amônia liberada pode seguir duas rotas. Pode ser utilizada para síntese de proteína microbiana ou absorvida através da parede ruminal e transformada no fígado em ureia que pode ser reciclada de volta ao rúmen ou excretada na urina.

A estratégia eficaz para reduzir o fornecimento de proteína alimentar é aumentar o rendimento de Pmic, uma vez que é de alto valor biológico e pode melhorar o desempenho animal, além de reduzir custos ou desperdícios gerados pela inclusão de excesso de proteína bruta na dieta (Lu et al., 2019).

A taxa, a velocidade e o tipo de fermentação dos substratos são influenciados por diferentes populações microbianas que podem ser suscetíveis ou resistentes aos componentes dietéticos. Por essa razão, manipular a fermentação ruminal surge como uma possibilidade de minimizar perdas de nitrogênio e de energia, bem como promover um ambiente favorável para aumentar a eficiência de síntese de Pmic. Na década de 70, descobriu-se uma série de compostos ativos que atendem pelo menos em parte esses princípios, os ionóforos antimicrobianos (Azzaz et al., 2015).

Segundo Lucci et al. (2001), o efeito dos ionóforos sobre a digestibilidade ruminal pode ser influenciado por fatores como adaptação, dieta, estado fisiológico, idade dos animais, tempo de incubação, tipo e dose do produto utilizado, entre outros. Os efeitos ionofóricos mais conhecidos são da monensina devido à sua ampla utilização no setor agropecuário (McGarvey et al., 2018; Ogunade et al., 2018) e foi descrita pela

primeira vez por Agtarap et al. (1967), como composto derivado de *Streptomyces cinnamonensis* e referido como ácido monésico de peso molecular de 670 Da.

A dimensão da molécula de monensina favorece a ligação do sódio ao invés do potássio (Armstrong, 2016), inibindo o crescimento bacteriano de gram-positivas pela formação de poros, que facilita a permeabilidade desse íon através da membrana celular. Em razão disso, o mecanismo da bomba iônica microbiana, na tentativa de manter osmolaridade intracelular utiliza sua energia de forma excessiva, até deprimir as suas reservas e se exaurir (Takano et al., 2015). Nesse contexto, há uma alteração dos perfis de ácidos graxos voláteis em favor da produção de propionato, reduzindo a degradação de aminoácidos e manipulação da biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen (Ogunade et al., 2018).

Inicialmente a monensina foi produzida para atingir células bacterianas individuais, o que na verdade aparenta ser promissor, mas no início do século 20 ficou claro que estas vivem em comunidades complexas chamadas de biofilmes e isso confere vantagem aos microrganismos, como resistência a antimicrobianos e possível transferência em nível de saúde pública (Penesyan et al., 2015).

Sendo assim, a União Europeia (UE, 2019) como medida profilática, proibiu o uso da monensina e gerou uma crescente atenção mundial a respeito. Nos Estados Unidos, a utilização da mesma também é proibida como aditivo em rações de ovinos devido ao possível efeito residual detectado em carcaças e vísceras, caso o período de carência não seja respeitado. Embora no Brasil não esteja disponível uma dose padronizada, na Austrália a Elanco (2011) recomenda 5-20 mg/kg de MS da dieta de monensina para ovinos, que não causaria resíduos na carcaça e comprometimento da saúde animal.

No entanto, é importante levar em consideração outros fatores, como o manejo de suplementação com monensina, que se consumida em excesso causa toxicidade. No Canadá, por exemplo, Jones (2001) relatou que uma dose de 448 ppm/animal/dia afetou um número de ovinos, mas foi devastador para o rebanho. No Brasil também foi constatado por Silva et al. (2016) a intoxicação de 40 ovinos alimentados com dose de 225 ppm por dia, equivalente a 11,25 mg/kg de peso corporal.

A limitação ao uso de antimicrobianos ionóforos para fins não terapêuticos baseia-se no surgimento de bactérias resistentes e isso tem incentivado pesquisas com agentes antimicrobianos não sintéticos, obtidos por extração utilizando órgãos de

plantas que produzem compostos do metabolismo secundário. Assim, há oportunidade de utilizar plantas como a algarobeira (*Prosopis juliflora*) como matéria-prima para obtenção de alcaloides com ação biogênica, que é uma alternativa promissora devido a sua rápida propagação e difusão no semiárido (Neto et al., 2015).

O uso de algaroba como fonte alimentar para ovinos já demonstrou seus efeitos positivos sobre o consumo, comportamento ingestivo e outros parâmetros nutricionais, quando utilizada em suplementos concentrados (Alves et al., 2010; Almeida et al., 2011; Pereira et al., 2013b; Neto et al., 2015). Desde então, estudos *in vitro* foram desenvolvidos por Santos et al. (2013) e Pereira et al. (2017), em doses 25, 50, 100, 200 mg/L e 3,9; 7,9 e 12 µg de extrato de vagem de algaroba, respectivamente. Nesses estudos, as propriedades antimicrobianas contra bactérias gram-positivas foram observadas, uma vez que, o princípio ativo dos alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) é de natureza ionofórica, com provável ação similar à monensina e que reduziu a produção de gases totais de fermentação ruminal *in vitro*, em particular na redução de metano.

Estudos com extratos vegetais remetem a uma preocupação a respeito da dose necessária para obter efeitos favoráveis e a padronização da concentração definida, que pode ser variável entre espécimes utilizados como matéria-prima e no processo de obtenção dos extratos.

Santos (2017) testou doses (2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg MS) de APA em ovinos e constatou redução no tempo de abate na dose de 9,2 mg/kg de APA e ainda inferiu que pode reduzir o fornecimento de proteína bruta sem prejuízos na retenção corporal de nitrogênio. Subsequentemente, Sousa (2018) utilizou doses de 6,6; 17,3 e 27,8 mg/kg de APA da dieta para ovinos e relatou melhor utilização da proteína bruta da dieta e mitigação de metano em doses entre 17,3 e 27,8 mg/kg de APA.

Dado o fato de que, o uso de antimicrobianos modifica o crescimento de microrganismos do rúmen e como consequência a fermentação é alterada, a quantificação da síntese de Pmic torna-se importante em estudos de avaliação de antimicrobianos na nutrição de ruminantes, uma vez que a proteína microbiana contribui com uma proporção próxima a 50% das exigências por proteína metabolizável em ruminantes (NRC, 2007).

Para quantificar o fluxo de Pmic do rúmen ao intestino delgado, a técnica que utiliza a excreção urinária de derivados de purina (DP) é muito difundida no meio

científico e é um método indireto (Chen & Gomes, 1992; Kozloski et al., 2017). Esta técnica não é invasiva, mas requer coleta de urina total de 24 h e tem por princípio o uso de DP urinário como marcador da síntese de Pmic. Para tornar a coleta de urina aplicável em qualquer sistema de criação de ruminantes e em fêmeas, a coleta *spot* de urina seria a mais adequada (Júnior et al., 2018).

Dessa forma, a atividade renal deve ser avaliada porque poderá interferir na acurácia do método (Pereira, 2015) A atividade renal além de ser modificada pelo tempo de alimentação (Muszczynski et al., 2015) como também pode ser alterada pelo uso de substâncias bioativas (Dermitas et al., 2018), como são os alcaloides piperidínicos de algaroba. Skotnika et al. (2007) relataram que, quando se utilizam fitoterápicos na alimentação animal, o conhecimento detalhado dos ritmos diurnos renais é útil para interpretação confiável dos resultados experimentais e são extremamente importantes para o desenvolvimento do manejo alimentar. A amostragem de urina *spot* em diferentes pontos de tempo como alternativa à coleta de urina total de 24 h, para obtenção da excreção urinária de derivados de purina, seria adequada nas condições de utilização da suplementação com APA em dietas para cordeiros?

A avaliação de dietas suplementadas com diferentes doses de APA em alternativa ao uso de monensina em cordeiros deve ser realizada para determinar a melhor dose a ser administrada nesta categoria. Os efeitos sobre o comportamento ingestivo, parâmetros nutricionais e atividade renal são considerados importantes, uma vez que estas variáveis servem de indicadores de possíveis alterações durante alimentação, digestão e pós-absorção nos cordeiros.

1.1 Monensina e alcaloides piperidínicos de algaroba como antimicrobianos

Antimicrobianos, também chamados de ionóforos são definidos como compostos que possuem a efetividade de inibir o crescimento de microrganismos, inicialmente utilizados como coccidiostáticos em aves e depois como melhoradores de desempenho em ruminantes. Atualmente, ainda são aprovados o uso de ionóforos antimicrobianos em diversos animais de importância econômica (Elanco 2011), apesar da proibição do uso de monensina pela União Européia e Estados Unidos somente para ovinos (UE, 2019; Elanco 2016).

Os mecanismos conhecidos por causar resistência podem ser divididos em três fatores principais: a mudança do mecanismo no alvo do antibiótico; a inativação do antibiótico ocasionada por enzimas secretadas por bactérias e a concentração ou dose utilizada não atinge níveis deletérios suficientes em células bacterianas. Este último pode ocorrer em duas situações: a primeira é a diminuição da permeabilidade da membrana através das porinas e a segunda é a efetividade das bombas de efluxo no descarte do composto (Aygül, 2015).

Desde a sua introdução, os ionóforos desempenharam papéis importantes na produção e sistemas em todo o mundo (Novilla, 2018) e sua exclusão total gera um desafio que estimula a busca imediata de produtos substitutivos. Em razão disso, os aditivos à base de extratos vegetais tendem a ser uma alternativa com propósito de substituição dos aditivos sintéticos, diminuindo assim, as limitações impostas por alguns mercados consumidores.

Prosopis juliflora, mais conhecida como algaroba, é nativa do norte da América do Sul, América Central e Caribe (William & Jafri, 2015) e sua abundância em regiões áridas e semiáridas permite fácil acesso e estudo sobre suas propriedades. A especificidade da ação farmacológica e toxicológica dos alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) tem sido investigada devido à limitação estabelecida por mercados consumidores. Segundo Kamra et al. (2006) e Valdes et al. (2014), a atividade antimicrobiana de extratos vegetais é altamente específica, o que traz a possibilidade de ação similar aos sintéticos, para manipular a fermentação ruminal inibindo seletivamente apenas alguns grupos de microrganismos ruminais.

Os alcaloides são derivados do metabolismo secundário, heterocíclico e ativo de plantas e eram considerados na sua maioria um fator negativo na alimentação animal, porém, estudos já comprovaram benefícios na produtividade animal (Calabro, 2015; Da Silva et al., 2018) e seus potenciais farmacológicos na forma de extratos de algaroba são bem descritos como antimicrobianos, antioxidantes, antimalárico, larvicida e inseticida, anti-helmínticas e diversas outras funções (Singh & Verma, 2011; Cushnie et al. 2014; William & Jafri 2015; Damasceno et al. 2017).

A conformação da estrutura química dos alcaloides piperidínicos pode encontrar-se no estado livre, na forma de sais ou óxidos (Santos, 2017) e o APA, por sua vez, se encontra na estrutura de sal, com massa molecular de 630 Da, com capacidade inibitória de bactérias gram-positivas (Santos et al., 2013). Os principais

presentes nas vagens são juliprosina, juliprosopina e pela primeira vez Santos et al., (2013), revelou prosoflorina.

Segundo Chourdary et al. (2005), a ação de APA parece ter afinidade pelos íons de Ca^{2+} e proteínas ligadoras de cálcio na célula bacteriana, em razão dos bloqueios dos canais de Ca^{2+} em células eucariotas poderiam funcionar em células procariotas devido à uma caracterização filogenética na membrana bacteriana com proteínas ligadoras de Ca^{2+} (CaBPs). Suas propriedades devem-se aos anéis indólicos e heretocíclicos que conferem caráter polar e apolar devido às longas cadeias de carbono. Essa dupla polaridade pode promover um efeito desorganizador na membrana celular, alterando o transporte de íons e outras substâncias importantes.

Deste modo, a ligação de alcaloides de piperidina a essas CaPBs podem desorganizar suas funções estruturais ou reguladoras de tamponamento, sensoriais e transdutoras de sinal, exaurindo energeticamente a célula bacteriana, comprometendo sua sobrevivência (Dominguez et al., 2015), uma vez que, o limite de exclusão molecular das porinas bacterianas estão em uma faixa de 600 a 800 Da (Zeth e Thein, 2010). Como resultado desse mecanismo de ação, eles tendem a otimizar a produção de propionato, diminuir a desaminação de aminoácidos da dieta e aumentar o fluxo de proteína para o intestino delgado e como consequência melhorar a digestibilidade da dieta (Júnior et al., 2017).

1.2 Método de derivados de purina urinários como marcadores de síntese de proteína microbiana

Os ruminantes utilizam nitrogênio proteico e não proteico a partir da proteína dietética. A fonte de proteína verdadeira é degradada em aminoácidos e amônia para que possam ser utilizadas pelos microrganismos a fim de sintetizar a proteína microbiana (Pmic). Isso garante alta digestibilidade com perfil de aminoácidos de grande importância para o desempenho animal. Além disso, aumentar o rendimento de Pmic é uma estratégia mais eficaz para reduzir o desperdício de proteína dietética, uma vez que, quando esta é excedente, é degradada em amônia no rúmen, metabolizada a ureia no fígado e excretada na urina (Lu et al., 2019).

A síntese proteica no rúmen é influenciada pela oferta de nutrientes e população microbiana (Thomas, 1973), sendo assim, a taxa de proliferação microbiana depende da

velocidade com que os microrganismos são estabelecidos no ambiente ruminal e do suprimento de nutrientes, como a disponibilidade de energia e nitrogênio. Ambos devem estar em quantidades equilibradas, sendo que a glicose fornece energia necessária para o crescimento celular e os peptídeos são direcionados para a síntese proteica dos microrganismos (Hackmann & Firkins, 2015).

Para mensurar esse fluxo microbiano, muitos métodos internos e externos foram desenvolvidos, dentre eles: 2,6 - ácido diaminopimélico (Czerkawski, 1974), bases purinas (Schelling e Byers, 1982), ¹⁵N (Siddons et al., 1985) e ³⁵S (Beever et al., 1987), porém são laboriosos e entraram em desuso. O método de derivados de purina (DP) surgiu como uma alternativa eficaz de substituição, pois não é invasivo e muito menos requer animais preparados cirurgicamente (Chen & Gomes, 1992).

Dado o fato de que, o uso de antimicrobianos modifica a fermentação ruminal e como consequência os microrganismos do rúmen são alterados e atuam como a principal fonte de proteína para os ruminantes, a excreção urinária de derivados de purina como produtos finais são variáveis importantes e oferecem estimativas confiáveis da proteína absorvida no intestino delgado (Chen & Gomes, 1992; Kozloski et al., 2017).

Segundo Kozloski et al., (2017), o fluxo de proteína microbiana para o duodeno pode ser considerado o mais importante e sensível marcador nutricional em ruminantes, pois há uma alta relação com DP. E isso garante o potencial de utilização do mesmo, uma vez que, os ácidos nucleicos e suas bases púricas dos microrganismos são metabolizados a derivados de purina (DP; alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina), excretados na urina e podem ser quantificados através de análises laboratoriais.

Até então, a limitação no uso dessa técnica em ovinos era a coleta de urina durante um período de 24 horas, porém Chen & Gomes (2004) constataram que, a coleta urinária pontual (*spot*) durante um horário do dia poderia ser realizada e corrigida pela creatinina, mas esse método baseia-se na premissa de que a excreção de creatinina durante o dia é constante (Santos et al., 2017).

Segundo Pereira (2015), dois fatores podem provocar oscilações e imprecisão do método de coleta *spot*, o primeiro é o volume de urina produzido, que depende da ingestão de água, mas nos cálculos de excreção essas alterações nos metabólitos são corrigidos facilmente. O segundo poderia ser a alteração na taxa de filtração glomerular (TFG), que não necessariamente traduz em variação do volume urinário, mas pode ser

influenciada por níveis proteicos dietéticos. Então, se a dieta promove redução da TFG, poderá ocorrer diminuição da concentração dos metabólitos na urina, inclusive de creatinina.

Para avaliar se a função renal é alterada pela dieta, a TFG é a prova laboratorial mais utilizada e é um índice de depuração de creatinina (Kirsztajn, 2009; Manuwar et al. 2017). A creatinina é um composto orgânico nitrogenado não proteico, formado a partir da desidratação da creatina e filtrada livremente pelos glomérulos renais, isto é, não há reabsorção tubular renal da substância. A biossíntese da creatinina inicia-se, quando a creatina é sintetizada principalmente no fígado e pâncreas, por ação das enzimas arginina:glicina amidinotransferase e guanidinoacetato metiltransferase (Wiss e Rima, 2000). Logo após, é fosforilada pela creatina quinase, catabolizada no músculo e livremente filtrada pelo glomérulo.

Se a TFG diminui, a concentração sanguínea de creatinina aumenta, apresentando uma relação recíproca entre TFG e concentração de creatinina sérica (Lohsiriwat, 2013). Isso ocorre porque a formação de urina ocorre com o resultado da filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção. Se uma substância é livremente filtrada no glomérulo, a depuração é equivalente a TFG; se exceder a TFG, o efeito tubular líquido é secreção; e se for inferior a TFG, o efeito líquido é a reabsorção, isto é, a substância não é filtrada livremente (Wang, 2009).

Como a homeostase do corpo e eletrólitos da água são regulados pelos rins através da filtração de plasma nos glomérulos, absorção e secreção nos túbulos renais (Voet, 2008), tais funções são eventos de grande complexidade, que se inter-relacionam e quaisquer alterações renais podem acarretar distúrbios no metabolismo e sub ou superestimação de parâmetros utilizados para estimar a produção.

Entende-se por depuração, o volume de sangue, que em unidade de tempo, após a filtração pelos rins, é depurado de uma determinada substância. Para avaliar essa depuração, a substância não pode ser absorvida e nem secretada nos túbulos renais, o que acontece com a creatinina, refletindo então a taxa de filtração glomerular. Nesse caso, a creatinina, é removida do plasma, especificando um volume a partir do qual é removida por unidade de tempo.

A razão entre derivados de purina/creatinina é referida como índice DPC e é corrigido pelo peso metabólico do animal para facilitar a comparação entre animais de diferentes pesos corporais. Ma et al. (2014), asseguram uma correlação linear positiva

($R = 0,93$) entre excreção total de DP e índice DPC. É utilizado em procedimentos de amostragens pontuais, quando a coleta total de urina não é viável (Dragomir et al., 2010), uma vez que, está relacionado ao fluxo de ingestão alimentar e purina microbiana intestinal, podendo ser usado então como um indicador do fluxo de nitrogênio microbiano intestinal (Valadares Filho et al., 2007).

A partir do índice DPC, pode-se estimar síntese de proteína microbiana em ovinos através de coletas *spot* de urina (Chen et al., 2004), quando não há alterações na TFG e conseqüentemente de creatinina ocasionadas pela dieta (Pereira, 2015), além disso, deve-se levar em consideração que a síntese de derivados de purina não é constante e pode variar conforme o tipo de dieta, e assim levar a sub ou superestimativa da digestibilidade da matéria orgânica, dependendo da eficiência com a qual é utilizada na síntese de proteína microbiana (David et al., 2015).

Ademais, utilizar a estimativa da excreção diária de creatinina em ovinos com base em dados de outros estudos, pode resultar em erros significativos e estes podem ser ainda maiores, se as amostragens pontuais de urina não forem representativas da urina total excretada. Sendo assim, é importante definir um tempo de coleta e constatar se houver variações na TFG para que se reduza o tempo de amostragem e a técnica seja aplicável em grandes grupos de animais.

Dado que, em bovinos já foi constatado que não há variações na excreção diária de creatinina, tempos de coleta e dieta, pode-se utilizar um valor literário referente à raça e idade do animal quando a coleta durante 24 horas não for possível (Barbosa et al., 2006; George et al., 2006; Leal et al., 2007; Chizzotti et al., 2008). Em ovinos a escassez de estudos avaliando tempo de coleta de urina não é capaz de promover esta mesma condição, mas estudos recentes conduzidos por Santos et al. (2018) recomenda-se a coleta de 3 horas após a alimentação como alternativa a coleta de urina de 24 horas para ovinos.

Essa falta de informação a respeito da precisão da técnica de amostragem pontual e a necessidade de tornar o método de coleta *spot* aplicável em ovinos requer uma melhor investigação a respeito de qual melhor horário será representativo a um período de 24 horas, sem abnegar o funcionamento da função renal.

1.3 Referências

AGTARAP, A., CHAMBERLIN, J.W., PINKERTON, M., STEINRAUF, L.K. Structure of monensic acid, a new biologically active compound. **Journal of the American Chemical Society**, v.89, p.5737-5739, 1967.

ALMEIDA, P.J.P.; AZEVEDO, S.T.; ALVES, E.M.; SOUZA, D.R.D.; SANTOS, A.B.D.; PEREIRA, T.C.D.J.; PEDREIRA, M.D.S. Fontes energéticas suplementares para ovinos Santa Inês em pastagens de capim urocloa na época seca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.12, p.140-154, 2011.

ALVES, E.M.; PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, C.A.S., AGUIAR, L.V., PEREIRA, M.L.A., PRESIDIO, P.J.A. Comportamento ingestivo de ovinos alimentados com farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.32, p.449-445, 2010.

ARMSTRONG, D.G. Gut-active growth promoters. **Control and Manipulation of Animal Growth: Proceedings of Previous Easter Schools in Agricultural Science**, v. 21, p.23. 2016.

AYGÜL, A. Antibiyotik Direncinde Dışa Atım Sistemlerinin ve Dirençle Mücadelede Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Önemi. **Mikrobiyol Bul**, v.49, p.278-291, 2015.

AZZAZ, H.H.; MURAD, H.A.; MORSY, T.A. Utility of ionophores for ruminant animals: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, p.254-265, 2015.

BARBOSA, A.M.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; VÉRAS, R.M.L; LEÃO, M.I.; DETMAN, E; PAULINO, M.F.; MARCONDES, M.I.; SOUZA, M.A. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes protéicas sobre a excreção de creatinina, de uréia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.870-877, 2006.

BEEVER, D.E.; LOSADA, H.R.; GALE, D.L; SPOONER, M.C. The use of monensin or formaldehyde to control the digestion of the nitrogenous constituents of perennial ryegrass (*Lolium perenne* cv. *Melle*) and white clover (*Trifolium repens* cv. *Blanca*) in the rumen of cattle. **British journal of nutrition**, v.57, p.57-67, 1987.

CALABRÒ, S. Plant secondary metabolites. In: **Rumen Microbiology: From evolution to revolution**. Springer, New Delhi, 2015. p. 153-159.

CHEN, X.B.; ØRSKOV, E.R. Research on urinary excretion of purine derivatives in ruminants: past, present and future. In: **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives**. Springer, Dordrecht, 2004. p.180-210.

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 technical details. **International Feed Resources Rowett Research Institute**, Bucksburn, ABR, United Kingdom, 21, 1992.

CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; TEDESCHI, L.O. Determination of creatinine excretion and evaluation of *spot* urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v.113, p.218-225, 2008.

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

CUSHNIE, T.P.T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A.J. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, p. 377-386, 2014.

CZERKAWSKI, J.W.; FAULDS, C. Methods for determining 2-6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.25, p.45-55, 1974.

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

DAMASCENO, G.A.B.; FERRARI, M.; GIORDANI, R.B. *Prosopis juliflora* (SW) DC, an invasive specie at the Brazilian Caatinga: phytochemical, pharmacological, toxicological and technological overview. **Phytochemistry reviews**, v.16, p.309-331, 2017.

DAVID, D.B; POLI, C.H.E.C; SAVIAN, G.A; AMARAL, G.A; AZEVEDO, E.B; JOCHIMS F. Uso da creatinina urinária como marcador nutricional e de volume urinário em ovinos alimentados com forragem tropical ou temperada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p.1009-1015, 2015.

DEMIRTAŞ, A.; ÖZTÜRK, H.; PIŞKIN, İ. Overview of plant extracts and plant secondary metabolites as alternatives to antibiotics for modification of ruminal fermentation. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.65, p.213-217, 2018.

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

DRAGOMIR, C.; VLASSA, M.; VASILACHI, A. Effect of the dietary protein source on the level of rumen microbial protein synthesis in growing rams. **Archiva Zootechnica**, v.13, p.28, 2010.

ELANCO ANIMAL HEALTH (2011), disponível em: <<https://apvma.gov.au/node/13186>>. Atualizado em 2018. Acesso em 10 de fev. 2019.

ELANCO ANIMAL HEALTH (2016), disponível em: <<https://www.fda.gov/animalveterinary/products/importexports/ucm315830.htm>>. Atualizado em 2018. Acesso em 13 de mar. 2019.

FANIYI, T.O.; ADEBGEYE, M.J.; ELGHANDOUR, M.M.Y; PILEGO, A.B.; SALEM, A.Z.M.; OLANIYI, T.A.; ADEWUMI, M.K. Role of diverse fermentative factors towards microbial community shift in ruminants. **Journal of applied microbiology**, 2019.

GEORGE, S.K., DIPU, M.T., MEHRA, U.R., VERMA, A.K., SINGH, P. Influence of level of feed intake on concentration of purine derivatives in urinary *spot* samples and microbial nitrogen supply in crossbred bulls. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**. v.9, p.1291-1297, 2006.

HACKMANN, T.J.; FIRKINS, J.L. Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. **Frontiers in microbiology**, v.6, p.465, 2015.

JONES, A. Monensin toxicosis in 2 sheep flocks. **The Canadian Veterinary Journal**, v.42, p.135, 2001.

JÚNIOR, J.M.S; RENNÓ, L.N; VALADARES FILHO, S.C; PAULINO, M.F; DETMANN, E.; MENEZES, G.C.C.; MARTINS, T.S; PAULA, R.M; RODRIGUES, J.P.P; MARCONDES, M.L. Evaluation of collection days and times to estimate urinary excretion of purine derivatives and nitrogen compounds in grazing Nellore cattle. **Livestock Science**, v.217, p. 85-91, 2018.

KAMRA, D.N.; AGARWAL, N.; CHAUDHARY, L.C. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. In: **International Congress Series**. Elsevier, 2006, p.156-163.

KIRSZTAJN, G. M. Avaliação de função renal. **Brazilian Journal of Nephrology**, v.31, p.14-20, 2009.

KOZLOSKI, G.V., STEFANELLO, C.M., OLIVEIRA, L., FILHO, H.R., KLOPFENSTEIN, T.J. Evaluation of urinary purine derivatives in comparison with duodenal purines for estimating rumen microbial protein supply in sheep. **Journal of Animal Science**, v.95, p.884-891, 2017.

LEAL, T.L.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; CAMPOS, J.M.S.; DETMANN, E.; BARBOSA, A.M.; TEXEIRA, R.M.A.; MARCONDES, M.I. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.905-911, 2007.

LOHSIRIWAT, S. Protein Diet and Estimated Glomerular Filtration Rate. **Open Journal of Nephrology**, v.3, p.97, 2013.

LU, Z.; XU, Z.; SHEN, Z. TIAN, Y.; SHEN, H. Dietary energy level promotes rumen microbial protein synthesis by improving the energy productivity of the ruminal microbiome. **Frontiers in microbiology**, v.10, p.847, 2019.

LUCCI, C.S.; PEIXOTO, K.C.J.; AMARO, F.R.; Rodrigues, P.H.M.; Almeida, T.F., Santos, M.V. Efeitos de níveis e de tempos de adaptação a lasalocida sódica sobre a degradabilidade ruminal do feno de coast-cross (*Cynodondactylon*) e do farelo de soja em bovinos. **Boletim da Indústria Animal**, v.58, p.95-112, 2001.

MA, T.; DENG, K.; TU, Y.; JIANG, C.; ZHANG, N.; LI, Y., SI, B.; LOU, C.; DIAO, Q. Effect of dietary concentrate: forage ratios and undegraded dietary protein on nitrogen balance and urinary excretion of purine derivatives in Dorper × thin-tailed Han crossbred lambs. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v.27, p.161, 2014.

MCGARVEY, J.A.; PLACE, S.; PALUMBO, J.; HNASKO, R.; MITLOEHNER, F. Dosage-dependent effects of monensin on the rumen microbiota of lactating dairy cattle. **Microbiology Open**, p.783, 2018.

MUNAWAR, Sh H.; IQBAL, Z.; MANZOOR, Z. Determination of renal handling of marbofloxacin in Lohi sheep (*Ovis aries*) following a single intravenous administration. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.18, p.49, 2017.

MUSZCZYNSKI, Z.; SKOTNICKA, E.; JANKOWIAK, D. Diurnal variations of renal activity in goats. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.39, p.455-464, 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. **National Academies Press**. 2007.

NETO, J.A.S.; OLIVEIRA, V.S.; VALENÇA, R.L. Leguminosas adaptadas como alternativa alimentar para ovinos no semiárido—revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 14, n. 2, p. 191-200, 2015.

NOVILLA, M.N. Ionophores. In: **Veterinary Toxicology**. Academic Press, 2018. p.1073-1092.

OGUNADE, I., SCHWEICKART, H., ANDRIES, K., LAY, J., & ADEYEMI, J. Monensin Alters the Functional and Metabolomic Profile of Rumen Microbiota in Beef Cattle. **Animals**, v.8, p.211, 2018.

OWENS, F.N.; BASALAN, M. Ruminal fermentation. In: **Rumenology**. Springer, Cham, 2016, p. 63-102.

PEREIRA, T.C.J. **Fontes energéticas e métodos de coleta de urina em ensaios de nutrição com cordeiros**. 2015. 114f. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil. 2015.

PEREIRA, T.C.J., PEREIRA, M.L.A., ALMEIDA, P.J.P., PEREIRA, C.A.R., SANTOS, A.B.D., SANTOS, E.D.J.D. Mesquite pod meal in diets for Santa Inês sheep: ingestive behavior. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.35, p.201-206, 2013.

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.

SANTOS, E.T; PEREIRA, M.L.A; SILVA, C.F.P.G, SOUZA-NETA, L.C; GERIS, R.; MARTINS, D.; SANTANA, A.E.G; BARBOSA, 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 Sciences**, v.14, p.8496-8516, 2013.

SANTOS, J.R.A. **Extrato alcaloídico da farinha de vagens integrais de algarobeiras em dietas para cordeiros confinados**. 2017. 77f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil. 2017.

SANTOS, A.C.S.; SANTOS, S.A.; CARVALHO, G.G.P.; MARIZ, L.D.S.; TOSTO, M.S.L.; VALADARES FILHO, S.C.; AZEVEDO, J.A.G. A comparative study on the excretion of urinary metabolites in goats and sheep to evaluate *spot* sampling applied to protein nutrition trials. **Journal of Animal Science**, v.96, p.3381-3397, 2018.

SILVA, R.V.M.M., CARVALHO, G.G.P., PIRES, A.J.V., PEREIRA, M.L.A., PEREIRA, L., CAMPOS, F.S., PERAZZO, A.F; BEZERRA, L.S; MOREIRA, J.V; RUFINO, L.M.A. Nitrogen balance, microbial protein synthesis and ingestive behavior of lambs fed diets containing cottonseed cake in substitution of soybean meal. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.2155-2166, 2016.

SIDDONS, R.C.; NOLAN, J.V.; BEEVER, D.E; MACRAE, J.C. Nitrogen digestion and metabolism in sheep consuming diets containing contrasting forms and levels of N. **British Journal of Nutrition**, v.54, p.175-187, 1985.

SINGH, S.S.; VERMA, S.K. Antibacterial properties of alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.2, p.114-20, 2011.

SCHELLING, G.T.; BYERS, F.M. Cytosine as a marker for microbial nitrogen leaving the rumen. **Canadian Journal of Animal Science**, v.64, p.52-53, 1984.

SKOTNICKA, E.; MUSZCZYŃSKI, Z.; DUDZINSKA, W.; SUSKA, M. A review of the renal system and diurnal variations of renal activity in livestock. **Irish Veterinary Journal**, v.60, p.161, 2007.

SOUSA, L.B. **Alcaloides piperidínicos de *Prosopis juliflora* como aditivo nutricional para cordeiros**. 2018. 57f. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil. 2018.

TAKANO, H.; NISHIYAMA, T.; AMANO, S. I.; BEPPU, T.; KOBAYASHI, M.; UEDA, K. Streptomyces metabolites in divergent microbial interactions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.43, p.143-148, 2016.

THOMAS, P.C. Microbial protein synthesis. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 32, p. 85-91, 1973.

UNIÃO EUROPÉIA - UE (2019). **Register of Feed Additives**, disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03.pdf>. Acesso em: 6 de mar. 2019.

VALADARES FILHO, S.C., PINA, D.S., AZEVÊDO, J.A.G., VALADARES, R.F.D. Estimativa da produção de proteína microbiana utilizando a excreção de derivados de purinas na urina. In: Simpósio Internacional Avanços em Técnicas de Pesquisa em Nutrição de Ruminantes, 2007. Pirassununga. **Anais...** Pirassununga, 2007. p.90-120.

VOET, D. **Fundamentos da bioquímica: a vida em nível molecular**. Porto Alegre: Artmed, 1264p. 2008.

WANG, H.; LONG, R.; ZHOU, W.; LI, X.; ZHOU, J.; GUO, X. A comparative study on urinary purine derivative excretion of yak (*Bos grunniens*), cattle (*Bos taurus*), and crossbred (*Bos taurus* × *Bos grunniens*) in the Qinghai-Tibetan plateau, China. **Journal of Animal Science**, v.87, p.2355-2362, 2009.

WILLIAM, K.; JAFRI, L. Mesquite (*Prosopis juliflora*): livestock grazing, its toxicity and management. **Journal of Bioresource Management**, v.2, p.7, 2015.

WYSS, M.; RIMA, K. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological reviews**. v.80, p.1107-1213, 2000.

ZETH, K., THEIN, M. Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations. **Biochemical Journal**, v.431, p.13-22, 2010.

II - OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de níveis de inclusão de extrato alcalóidico de algaroba comparados à monensina sódica em dieta para ovinos.

III - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo I

- i) Avaliar o comportamento ingestivo;
- ii) Determinar o consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana;

Capítulo II

- iii) Avaliar a excreção e depuração de creatinina;
- iv) Comparar métodos de coleta utilizando coleta *spot* e coleta total acumulativa de urina em intervalos de 4 horas, com coleta total de urina com duração de 24 horas em ovinos.

IV – CAPÍTULO I

COMPORTAMENTO INGESTIVO E PARÂMETROS NUTRICIONAIS EM OVINOS ALIMENTADOS COM NÍVEIS DE ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE ALGAROBA

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos de dietas aditivadas com níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA: 0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg MS) em comparação com monensina (MON: 2,1 mg/kg MS) sobre o comportamento ingestivo e parâmetros nutricionais em ovinos. Utilizou-se 400 g de feno de Tifton 85 e 600 g de concentrado por kg de MS da dieta. O comportamento ingestivo foi avaliado em 30 cordeiros Dorper x Santa Inês, machos não castrados, confinados e peso médio inicial de $17,50 \pm 0,43$ kg durante 4 períodos de coleta de dados, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 6 repetições durante 84 dias. Para avaliar o consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e síntese microbiana no rúmen, foram utilizados 5 cordeiros Dorper x Santa Inês, machos não castrados, confinados e peso médio inicial de $21,05 \pm 0,54$. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino 5×5 , durante 95 dias. O consumo de MS e de FDN não diferiu entre os aditivos e níveis de APA ($P > 0,05$). O tempo de ruminação e de mastigação de MS e de FDN, mastigações meréricas e tempo de mastigação por bolo apresentou resposta quadrática com ponto de mínimo na dose de 5,6 mg/kg em função de APA ($P < 0,05$). A eficiência de alimentação não foi afetada com o uso dos aditivos nas dietas ($P > 0,05$), mas a eficiência de ruminação para MS e FDN apresentou efeito quadrático com ponto de máximo de 5,4 mg/kg de MS de APA ($P < 0,05$). Não houve efeito ($P > 0,05$) dos aditivos e nem dos níveis de APA sobre o consumo de PB, EE, NDT, CNF e EM. A Digestibilidade de PB apresentou efeito quadrático com ponto de máximo de 4,5 mg/kg de MS de APA na dieta ($P < 0,05$). A excreção urinária de nitrogênio (N) não foi influenciada pela dieta ($P > 0,05$) e a excreção de N fecal e produção microbiana apresentou efeito quadrático com ponto de mínimo no nível 4,5 mg/kg de MS de APA ($P < 0,05$). Os níveis de APA apresentam efeito dose-dependente sobre a digestão ruminal sem afetar o consumo em ovinos, sendo que doses de 2,3 a 4,5 mg/kg reduzem a perda de N fecal e aumentam a retenção de N, doses de 4,5 a 6,6 mg/kg reduzem a atividade de ruminação e a síntese de proteína microbiana e doses de 6,6 a 9,2 mg/kg aumentam a atividade de ruminação e a síntese de proteína microbiana.

Palavras-chave: balanço de nitrogênio, dose-dependente, monensina

* Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-orientador: Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

IV - CHAPTER I
INGESTIVE BEHAVIOR AND NUTRITIONAL PARAMETERS IN
SHEEP FED WITH MESQUITE PIPERIDINE ALKALOIDS
LEVELS

ABSTRACT

The goal of this study was to evaluate the effects of diets with piperidine alkaloids (APA: 0, 2.3, 4.6 and 9.2 mg/kg DM) compared to monensin (MON: 2.1 mg/kg DM) on ingestive behavior and nutritional parameters in sheep. 400 g of Tifton 85 hay and 600g of concentrate per kg of diet DM were used. The ingestive behavior was evaluated in 30 Dorper x Santa Inês lambs, uncastrated male, housed and mean initial weight of 17.50 ± 0.43 kg during 4 periods of data collection, distributed in a completely randomized design with 5 treatments and 6 replicates for 84 days. To evaluate the consumption, digestibility, nitrogen balance and microbial synthesis in the rumen, 5 Dorper x Santa Inês lambs, uncastrated male, confined and average initial body weight of 21.05 ± 0.54 were used. The animals were randomly distributed in a 5 x 5 latin square design for 95 days. Consumption of DM and NDF did not differ between additives and APA levels ($P > 0.05$). The rumination and chewing time of DM and NDF, merit chewing and chewing time per cake showed a quadratic relationship with a minimum dose point of 5.6 mg/kg as a function of MPA ($P < 0.05$). The feed efficiency was not affected by the use of the additives in the diets ($P > 0.05$), but the rumination efficiency for DM and NDF showed a quadratic effect with a maximum point of 5.4 mg/kg MPA MS ($P < 0.05$). There was no effect ($P > 0.05$) of the additives and neither of the MPA levels on CP, EE, TDN, FCN and DM. The digestibility of CP showed a quadratic effect with maximum point at 4.5 mg/kg of DM of MPA in the diet ($P < 0.05$). The urinary excretion of nitrogen (N) was not influenced by the diet ($P > 0.05$) and the excretion of fecal N and microbial production presented a quadratic effect with a minimum point at the 4.5 mg/kg MPA level ($P < 0.05$). MPA levels have a dose-dependent effect on ruminal digestion without affecting consumption in sheep, and doses of 2.3 to 4.5 mg/kg reduce fecal N loss and increase N retention, doses of 4.5 to 6.6 mg/kg reduced rumination activity and microbial protein synthesis and doses of 6.6 to 9.2 mg/kg increased rumination activity and microbial protein synthesis.

Key words: nitrogen balance, dose-dependent, monensin

* Adsiver: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-adsiver: Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos fornecidos pode causar alterações no comportamento ingestivo dos ruminantes, no que diz respeito às atividades fisiológicas e temporárias de alimentação, ruminação e ócio. A compreensão mecanicista e o ritmo da regulação do consumo de alimentos são necessários para prever a ingestão e avaliar os efeitos metabólicos e produtivos em ruminantes (Nikkahar, 2014).

É fato que aditivos, principalmente ionóforos, podem estar inclusos no plano nutricional contribuindo para que tais processos citados acima sejam melhorados. Apesar de o uso de antimicrobianos ser aprovado em muitos países, a pesquisa tem investigado se os resíduos chegam aos produtos finais para o consumidor, gerando um desafio pela busca imediata de produtos vegetais substitutos que melhorem a produtividade da pecuária de forma sustentável (Patra e Saxena, 2009; Tajodini et al., 2014).

A literatura descreve vários compostos ativos de espécies de *Prosopis* e diferentes atividades de compostos presentes nas vagens dessas leguminosas, inclusive as atividades antimicrobianas dos alcaloides piperidínicos de *P. juliflora* (Henciya et al., 2017; Preeti et al., 2015 e Soni et al., 2018). Em ensaios de digestão ruminal *in vitro* conduzidos por Batatinha, (1997) e Santos et al. (2013) foi evidenciado que o extrato rico em alcaloides de vagens de algarobeiras alterou os produtos de fermentação. Os principais alcaloides encontrados no extrato clorofórmico básico de algaroba foram prosoflorina, juliprosina e julipropina e foi demonstrado que esses compostos alcalinos e hidrofóbicos apresentam propriedade de atuação como ionóforo na membrana plasmática da célula e de inibição de bactérias gram-positivas com potencial de substituir a monensina (Choudary et al., 2005; Santos et al., 2013; Pereira et al., 2017).

Em estudo de produção de metano, Sousa (2018) utilizou doses de 6,6; 17,3 e 27,8 mg/kg de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) em dietas para ovinos e demonstrou a mitigação de metano em doses entre 17,3 e 27,8 mg/kg de APA. Em ensaio de desempenho com cordeiros, Santos (2017) testou doses crescentes de APA nas dietas (2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg MS), constatando maior peso corporal final de cordeiros alimentados com a maior dose de APA.

Diante desses resultados promissores, a utilização de APA na alimentação de ovinos poderá ser recomendada não somente por avaliação de desempenho, mas após

vários estudos envolvendo avaliação comportamental, nutricional e metabólico-toxicológica. Assim, objetivou-se nesse estudo avaliar o comportamento ingestivo e parâmetros nutricionais em ovinos alimentados com doses de APA (2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg de MS da dieta).

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no setor de ovinos e caprinos (SETOC), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* Juvino Oliveira, Itapetinga-BA. A aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) está sob Protocolo nº 23/2013.

O comportamento ingestivo foi avaliado através de 30 ovinos Dorper x Santa Inês, machos não castrados, dispostos em baias individuais com peso médio $17,50 \pm 0,43$ kg durante 4 períodos. Os animais foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com 5 tratamentos e 6 repetições durante 84 dias, sendo os primeiros 16 dias de adaptação e 5 dias de coleta.

O consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e síntese microbiana foram avaliados através de 5 ovinos do mesmo grupo genético e idade, confinados em gaiolas metabólicas com idade aproximada de 120 dias e peso médio inicial de $21,05 \pm 0,54$ kg e peso médio final $41,03 \pm 2,74$ kg. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino 5 x 5, durante 95 dias, sendo 14 dias de adaptação e 5 dias de coleta.

Obtenção de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

As vagens maduras de (*Prosopis juliflora*) foram obtidas no município de Brumado/BA, colhidas manualmente após caírem no chão e ensacadas, no período de junho a julho de 2014. Foram selecionadas apenas vagens sem alterações no pericarpo. Devido à presença de umidade no material, as vagens foram espalhadas em uma lona em estufa de vegetação para secagem, durante três dias, com controle da temperatura em $30^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ para evitar perdas das propriedades dos alcaloides. Ao final da tarde, todo o material era coberto para evitar a umidade do ar durante a noite. Posteriormente à secagem, as vagens foram processadas em moinho tipo Willey com utilização de peneira com malha de 2 mm para obtenção de 10 kg de farinha das vagens integrais. O material obtido foi embalado em sacos de polietileno e acondicionado em freezer. Após a moagem, a farinha integral de vagens (algaroba) foi destinada à produção de extrato alcaloídico, conforme descrito por Santos (2017).

Dietas experimentais

As dietas foram balanceadas mediante estimativa de exigências, conforme equações do NRC (2007), considerando ganho de peso diário de 200 g; com 75% de digestibilidade de MS e 40% de proteína degradável no rúmen e o consumo de água foi *ad libitum*. As dietas experimentais consistiram na adição de monensina sódica (2,1 mg/kg MS) e nos níveis de adição de APA (0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg MS).

As proporções dos ingredientes da dieta e composição química do volumoso e concentrado estão na Tabela 1.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes da dieta e composição química do feno de Tifton 85 e concentrado

Ingredientes	Dieta experimental (g/kg MS)	
Feno de Tifton 85	400	
Farelo de milho	450	
Farelo de soja	130	
Sal mineral ^A	15	
Ureia	4	
Energia Metabolizável (MJ/kg MS)	9,7	
Nutrientes (g/kg MS)	Feno de Tifton 85	Concentrado
Matéria seca	855,1	882,2
Matéria orgânica	922,2	960,3
Proteína bruta	70,9	167,0
Proteína insolúvel em detergente neutro	47,7	130,5
Proteína insolúvel em detergente ácido	40,2	57,3
Extrato etéreo	36,0	21,0
Carboidratos totais	820,3	703,5
Carboidratos não fibrosos	44,7	237,7
Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína	775,6	465,8
Hemicelulose	134,4	278,7
Celulose	561,6	181,0
Lignina	132,0	25,5
Nutrientes digestíveis totais	391,2	722,3

^ASal Mineral = composição: 120 g Ca/kg, 87 g P/kg, 147 g Na/kg, 18 g S/kg, 590 mg Cu/kg, 40 mg Co/kg, 20 mg Cr/kg, 1,8 g Fe/kg, 80 mg I/kg, 1,3 g Mn/kg, 15 mg Se/kg, 3,8 g Zn/kg, 300 mg Mo/kg, 870 mg F/kg (máx.), de solubilidade do fósforo (P) em ácido cítrico a 2% (mín.) – 95%.

As dietas foram fornecidas diariamente às 07h00min e 15h00min, *ad libitum*, de forma a permitir 10% do fornecimento em sobras. Entretanto, o consumo voluntário diário foi calculado pela diferença entre a dieta total oferecida e as sobras colhidas e pesadas duas vezes ao dia.

A dose de monensina (MON) 2,1 mg/kg MS na dieta foi utilizada para comparar com a menor concentração de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA), que foi de 2,3 mg/kg MS. Os aditivos (MON e APA) foram misturados aos minerais e, em

seguida, adicionados aos demais ingredientes de cada concentrado no misturador industrial.

Coletas e análises laboratoriais

Consumo e digestibilidade de nutrientes

As amostras de volumoso e de concentrados fornecidos, bem como de sobras e de fezes referentes a cada animal foram colhidas do 14º ao 19º dia de cada período experimental, acondicionadas em sacos de polietileno e armazenadas em freezer a -20°C, para posteriores análises químicas, realizadas no laboratório de Forragicultura e Pastagens da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus Juvino Oliveira*, Itapetinga, Bahia.

Amostras do volumoso e concentrados de cada animal foram pré-secadas em estufa com ventilação forçada a 60°C por 72 horas e, em seguida, moídas em moinho de faca tipo Willey em peneira com malha de 1 mm para análises químicas. Nas amostras de alimentos (sobras e fornecidos) foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) (AOAC, 2010).

Para as análises de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram tratadas com alfa-amilase termoestável, sem o uso de sulfito de sódio e corrigidas para cinzas residuais segundo 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) foram feitas conforme Licitra et al. (1996).

A lignina foi obtida a partir da metodologia descrita em Detmann et al. (2012), com o resíduo do FDA tratado com ácido sulfúrico a 72% nas amostras de volumoso e concentrados. Segundo Sniffen et al. (1992), os carboidratos totais (CT) foram estimados da seguinte forma:

$$CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%cinzas)$$

Os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados com adaptação ao proposto por Hall (2003), utilizando o FDN_{cp}, conforme equação:

$$CNF = (100 - \%FDN_{cp} - \%PB + \%EE + cinzas)$$

O consumo de MS, MM, PB, FDN_{cp}, CT, CNF, EE, NDT e EM foi mensurado durante o 14º ao 19º dia de cada período experimental, através da quantidade da dieta

fornecida, subtraindo-se as sobras. Dessa forma, a digestibilidade aparente dos nutrientes foi avaliada através do consumo voluntário individual dos animais.

A coleta total de fezes foi efetuada com o uso de bolsas coletoras presas ao corpo de todos os cordeiros, permanecendo por três dias para adaptação e por mais três dias para coleta de fezes, em cada período. A quantidade diária de fezes foi mensurada, utilizando balança digital com precisão de 0,1 g e armazenada em congelador a -10°C. No último dia de coleta, após homogeneização, foram retiradas alíquotas de 5% da produção fecal de cada dia, para confecção de amostras compostas de cada animal.

Os coeficientes de digestibilidade (CD) da matéria seca (DMS), matéria orgânica (DMO), proteína bruta (DPB), extrato etéreo (DEE), fibra em detergente neutro (FDNcp) e dos carboidratos não fibrosos (DCNF) de cada dieta, foram determinados por meio do cálculo:

$$CD = [(\text{nutriente consumido} - \text{nutriente excretado nas fezes}) \times 100] / (\text{nutriente ingerido})$$

Os nutrientes digestíveis totais (NDT), obtidos com o ensaio de digestibilidade, foram calculados segundo Weiss (1999), mas utilizando a FDNcp e CNF corrigidos para cinzas e proteínas, pela seguinte equação:

$$NDT = PBD + FDNcpD + CNFD + 2,25 \times EED$$

Em que: PBD = PB digestível; FDNcpD = FDNcp digestível; CNFD = CNF digestíveis; e EED = EE digestível.

Os teores de nutrientes digestíveis totais estimados (NDT) dos alimentos e dietas totais foram calculados conforme equações descritas pelo NRC (2001).

Os valores de NDT foram convertidos em energia líquida (EL) e energia digestível (ED), utilizando-se as equações sugeridas pelo NRC (2001):

$$EL \text{ (Mcal/kg)} = 0,0245 \times NDT - 0,12$$

$$ED \text{ (Mcal/kg)} = 0,04409 \times NDT$$

A transformação de ED para energia metabolizável (EM) foi feita segundo:

$$EM \text{ (Mcal/kg)} = 1,01 \times ED \text{ (Mcal/kg)} - 0,45$$

Comportamento ingestivo

O comportamento ingestivo foi avaliado em 30 cordeiros no 20º dia de cada período experimental. Os cordeiros foram observados durante 24 horas, com auxílio de cronômetros digitais, em intervalos de dez minutos, com três observações por animal. Para a avaliação dos tempos de alimentação, ruminação e ócio. Observaram-se números

de mastigações por bolo ruminal, contabilizando o tempo gasto para ruminação de cada bolo. As variáveis comportamentais observadas foram: alimentação, ruminação, ócio, eficiência alimentar, eficiência em ruminação e consumo médio de MS e FDN_{cp} por período de alimentação; considerou-se o consumo voluntário de MS e FDN_{cp} dos dias de realização do comportamento ingestivo.

O consumo individual dos animais foi mensurado no final do comportamento ingestivo, em cada período de 21° dias de fornecimento das dietas experimentais, subtraindo-se das sobras à quantidade de dieta ofertada para cada animal. Dessa forma, foram avaliados os consumos de MS, FDN_{cp}.

As variáveis foram obtidas através das equações a seguir:

Tempo de alimentação

$$\text{min/kg MS (min/kg)} = \text{TAL/CMS}$$

$$\text{min/kg FDN (min/kg)} = \text{TAL/CFDN}_{cp}$$

Tempo de ruminação

$$\text{min/kg MS (min/kg)} = \text{TRU/CMS}$$

$$\text{min/kg FDN (min/kg)} = \text{TRU/CFDN}_{cp}$$

Em que, TAL (min/dia): tempo de alimentação; CMS (g/dia): consumo de matéria seca; CFDN_{cp} (g/dia): consumo de fibra de detergente neutro corrigido para cinzas e proteína; TRU (min/dia): tempo de ruminação.

As variáveis foram obtidas através das equações descritas por Bürger et al., (2000):

$$\text{EAL}_{MS} \text{ (g/h)} = \text{CMS/TAL};$$

$$\text{EAL}_{\text{FDN}_{cp}} \text{ (g/h)} = \text{CFDN}_{cp}/\text{TAL};$$

$$\text{ERU}_{MS} \text{ (g/h)} = \text{CMS/TRU};$$

$$\text{ERU}_{\text{FDN}_{cp}} \text{ (g/h)} = \text{CFDN}_{cp}/\text{TRU};$$

$$\text{NBR (n}^\circ/\text{dia)} = \text{TRU/TMM}$$

$$\text{gMS/bolo (n}^\circ/\text{g)} = \text{gMS/NBR}$$

$$\text{gFDN}_{cp}/\text{bolo (n}^\circ/\text{g)} = \text{gFDN}_{cp}/\text{NBR}$$

$$\text{NMM (n/dia)} = \text{NM/boloxNBR}$$

$$\text{TMT (h/dia)} = \text{TAL+TRU}$$

$$\text{min/kg MS (min/kg)} = \text{TMT/gMS}$$

$$\text{min/kg FDN}_{cp} \text{ (min/kg)} = \text{TMT/gFDN}_{cp}$$

Em que EAL (g MS/h e g FDN_{cp}/h): eficiência de alimentação; ERU (g MS/h e g FDN_{cp}/h): eficiência de ruminação; NBR (n°/dia): número de bolos ruminados; TMM

(s): tempo de mastigação merícicas; NMM (nº/dia): número de mastigação merícicas; TMT (h/dia): tempo mastigação total.

Balanço de nitrogênio e síntese microbiana

Após o fornecimento da alimentação no 18º dia de cada período experimental, coletou-se urina total do período de 24 h, que teve duração até 19º dia. A amostragem foi feita por micção espontânea dos animais, com um recipiente coletor com ácido. Foram adicionados 100 mL de ácido sulfúrico a 20%, e ao final da coleta, pesada, homogeneizada e filtrada em gaze, retirando uma alíquota de 10% do volume diário em cada período.

As amostras foram elaboradas com pH ácido (< 3) para evitar a destruição bacteriana dos metabólitos presentes na urina e, logo após, armazenadas a -20°C, no qual foram destinadas à quantificação das concentrações urinárias de nitrogênio total, alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, bem como para mensuração do volume urinário diário.

As concentrações de ácido úrico na urina foram determinadas utilizando-se *kits* comerciais (Bioclin®). Os teores urinários de alantoína, xantina e hipoxantina foram determinados por meio de métodos colorimétricos, conforme especificações de Chen & Gomes (1992), e o teor de nitrogênio total obtido pelo método de micro Kjeldhal (Silva e Queiroz, 2002). O balanço de nitrogênio (N-retido, g/dia) foi calculado com a fórmula: N-retido = N ingerido (g) – N nas fezes (g) – N na urina (g).

A excreção de derivados de purinas totais (DP) foi obtida pela soma das quantidades de alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina excretadas na urina (mmol/L).

A quantidade de purinas microbianas absorvidas (mmol/dia) foi estimada a partir da excreção de derivados de purinas totais (mmol/dia), por meio da equação proposta por Chen & Gomes (1992), para ovinos:

$$DP \text{ (mmol/dia)} = 0,84 PA + (0,150 PC^{0,75} e^{-0,25PA})$$

Em que: PA são as purinas absorvidas (mmol/dia).

A produção microbiana (g/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (PA, mmol/dia), utilizando-se a equação descrita por Chen & Gomes (1992):

$$NM = 70 PA / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$$

Em que: 70 é o conteúdo de N de purinas (mg N mmol/dia); 0,83 é a digestibilidade das purinas microbianas absorvidas e 0,116 é a razão N-purina/N-total nas bactérias.

Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pelo procedimento geral de modelos lineares (PROC GLM) do programa computacional estatístico SAS (SAS, 2006). Realizou-se contraste entre dietas MON vs APA 2,3 mg/kg de MS e MON vs APA 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg de MS, bem como contrastes polinomiais para os componentes linear (L) e quadrático (Q) na análise de médias das variáveis dependentes em função dos níveis de APA. Adotou-se como nível de significância 5% de probabilidade.

O modelo matemático utilizado para análise do comportamento ingestivo foi:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, a; j = 1, \dots, n$$

Em que:

Y_{ij} = observação j em grupo ou tratamento i

μ = média geral

τ_i = o efeito fixo de grupo ou tratamento i (denota um parâmetro desconhecido)

ε_{ij} = erro aleatório com média 0 e variância σ^2

A variável independente τ , frequentemente chamada de fator, representa os efeitos de diferentes tratamentos. O fator influencia os valores da variável dependente y.

O modelo matemático utilizado para consumo, digestibilidade, balanço de nitrogênio e síntese microbiana foi:

$$Y_{ij}(k) = \mu + \text{per}_i + \text{An}_{ij} + \tau(k) + \varepsilon_{ij}(k) \quad i, j, k = 1, \dots, r$$

Em que:

$Y_{ij}(k)$ = observação ij (k)

μ = média geral

Per_i = o efeito do período i

An_{ij} = o efeito do animal j

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

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

r = número de tratamentos, período e animal

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O consumo de MS e de FDN não diferiu entre os aditivos ($P > 0,05$), assim como os níveis crescentes de APA também não o afetaram ($P > 0,05$) (Tabelas 2 e 3), sendo o aumento linear do consumo de FDN ocasionado pela interferência do peso corporal (PC) (Tabela 2).

Tabela 2. Comportamento ingestivo em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	MON 2,1	Níveis de APA (mg/kg MS)				EPM	MON vs APA 2,3	MON vs APA	Valor de P	
		0	2,3	4,6	9,3				L	Q
Consumo, g/dia										
MS	1007	1071	1075	1132	1100	19,01	0,245	0,094	0,485	0,661
FDN	537,5	555,7	551,1	601,3	574,6	6,81	0,511	0,124	0,047 ^A	0,350
Consumo, g/kg PC										
MS	41,19	41,38	41,94	42,70	40,20	0,91	0,795	0,857	0,766	0,465
FDN	22,13	21,64	21,45	22,74	21,04	0,44	0,621	0,731	0,913	0,452
Alimentação										
min/d	209,7	216,0	219,5	217,5	222,4	5,64	0,560	0,570	0,740	0,951
min/kg MS	222,3	214,9	208,3	193,3	206,0	11,26	0,530	0,416	0,614	0,537
min/kg FDN	401,5	393,4	401,5	362,0	388,9	0,57	0,999	0,641	0,605	0,668
Ruminação										
min/d	504,8	558,0	461,1	470,8	492,7	9,14	0,109	0,139	0,048	0,006 ^B
min/kg MS	535,1	550,5	433,8	417,2	458,3	20,78	0,025	0,026	0,095	0,016 ^C
min/kg FDN	975,3	1012	837,5	785,4	860,6	20,07	0,024	0,018	0,009	0,003 ^D
Mastigação										
Nº/bolo	61,60	62,94	55,02	54,56	57,70	0,79	0,004	0,009	0,003	0,000 ^E
s/bolo	42,49	43,51	38,72	39,32	43,14	0,58	0,030	0,257	0,912	0,000 ^F
min/d	714,5	773,5	680,5	688,3	715,0	10,47	0,289	0,446	0,111	0,011 ^G
min/kg MS	757,4	765,4	642,0	610,5	664,3	20,07	0,059	0,052	0,167	0,045 ^H
min/kg FDN	1376,7	1405,7	1239,0	1147,5	1249,5	25,44	0,069	0,034	0,020	0,009 ^I
Ócio										
min/d	725,5	666,0	759,5	751,7	725,0	10,47	0,289	0,373	0,115	0,017 ^J

$$^A Y = 2,8509X + 559,2 \quad (r^2 = 0,2411)$$

$$^B Y = 3,2596X^2 - 35,832 X + 549,35 \quad (R^2 = 0,84)$$

$$^C Y = 4,6065X^2 - 51,508 X + 544,34 \quad (R^2 = 0,96)$$

$$^D Y = 7,5348X^2 - 85,034 X + 1006,9 \quad (R^2 = 0,99)$$

$$^E Y = 0,3116X^2 - 3,3636 X + 62,44 \quad (R^2 = 0,93)$$

$$^F Y = 0,2184X^2 - 1,9958 X + 43,14 \quad (R^2 = 0,91)$$

$$^G Y = 3,2693X^2 - 35,28 X + 765,53 \quad (R^2 = 0,86)$$

$$^H Y = 5,2728X^2 - 58,871 X + 761,07 \quad (R^2 = 0,98)$$

$$^I Y = 8,3837X^2 - 94,343 X + 1407,3 \quad (R^2 = 0,99)$$

$$^J Y = -3,2849X^2 + 35,477 X + 673,99 \quad (R^2 = 0,86)$$

Para o tempo de ruminação e de mastigação de MS e de FDN houve resposta quadrática ($P < 0,05$) em função dos níveis de APA nas dietas, estimando-se tempos mínimos na dose de 5,6 mg/kg de MS da dieta, indicando maior eficiência de ruminação. De forma semelhante, o número de mastigações meréricas por bolo ruminado e o tempo (s) de mastigação realizado por bolo também foram alterados de forma quadrática, estimando-se pontos mínimos nas doses de APA de 5,4 e 4,6 mg/kg MS, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

A manutenção do consumo voluntário indica que as doses utilizadas de APA não afetaram a ingestão, apesar do aumento do tempo gasto de ruminação de MS e de FDN em doses de APA superiores a 5,6 mg/kg (Tabela 3). Ítavo et al. (2011a; 2011b) observaram que o consumo de MS e de FDN reduziu em cordeiros com PC inicial médio de 20,4 kg submetidos a extratos de própolis verde e marrom, que não diferiram da monensina (30 mg/animal/dia). Esses autores verificaram que a suplementação com própolis verde aumentou a eficiência de ruminação. Os compostos secundários em extratos vegetais adicionados em dietas para ruminantes podem interferir no comportamento ingestivo, nos processos digestivos e na fermentação ruminal (Durmic & Blache, 2012). Porém, a suplementação com APA demonstrou que o aumento do tempo gasto de ruminação por unidade de MS e de FDN não limita a ingestão em cordeiros por reduzir o tempo de ócio.

O comportamento de ruminação alterado pode estar associado a mudanças na taxa de degradação (fermentação) induzida pela presença dos alcaloides, em que não necessariamente corresponde a efeitos deletérios sobre a população microbiana (Petri et al., 2019), uma vez que, em condições físico-químicas normais, estudos *in vitro* asseguram que, muitos grupos de alcaloides melhoraram a fermentação ruminal (Mickdam et al., 2016).

A cinética da morte de células bacterianas geralmente segue uma função exponencial por curvas obtidas para as células sobreviventes em função da dose de um agente antimicrobiano (Dawes e Sutherland, 1992). Assim, doses de APA estimadas dentro do intervalo de 4,6 a 5,6 mg/kg MS provavelmente melhoraram a fermentação no rúmen, demonstrando que o microbioma resistente foi efetivo em degradar os componentes nutricionais da dieta. Dessa forma, é evidenciado que a digestão microbiana da fibra não foi afetada nesta faixa de dose de APA, refletindo no menor tempo gasto para as atividades de ruminação.

O efeito dose-dependente permite inferir que houve uma ação antimicrobiana seletiva do APA no rúmen e consistente com as alterações nas atividades de ruminação, mesmo permanecendo ainda uma importante questão sem resposta como, quais espécies de bactérias foram selecionadas na presença de APA.

A eficiência de alimentação não foi afetada com o uso dos aditivos nas dietas ($P > 0,05$). A eficiência de ruminação para MS e FDN foi influenciada pelos níveis de APA ($P < 0,05$), apresentando efeito quadrático com pontos máximos no nível de 5,4 mg/kg MS de APA. Quando a eficiência de ruminação é comparada entre os aditivos, observa-se que a quantidade de MS ruminada (g/h) foi menor para MON, portanto melhor, enquanto que a quantidade de FDN ruminada (g/h) foi maior com o uso de APA em doses superiores a 2,3 mg/kg. (Tabela 3).

A ruminação é considerada uma ação fisiológica desencadeada em frequências variadas dependendo da qualidade da dieta (Perazzo et al., 2017). Em um estudo sobre comportamento ingestivo em ovinos, Perazzo et al. (2016) observaram uma correlação positiva entre o consumo e eficiência de ruminação. Embora, resultados encontrados neste estudo não tenham constatado efeito para consumo, o menor tempo de ruminação e mastigação observado (Tabela 2) explica a maior eficiência de ruminação com a utilização da dose de 5,4 mg/kg (Tabela 3).

Tabela 3. Eficiência de alimentação (EAL) e de ruminação (ERU) em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperídnicos de algaroba (APA)

ITEM	MON 2,1	Níveis de APA (mg/kg MS)				EPM	MON vs APA 2,3	MON vs APA	Valor de <i>P</i>	
		0	2,3	4,6	9,3				L	Q
EAL, g/h										
MS	608,0	316,7	302,9	328,7	315,6	67,26	0,147	0,370	0,845	0,987
FDN	306,7	163,0	154,9	176,0	166,3	31,96	0,130	0,362	0,555	0,941
ERU										
Bolos (Nº/d)	209,7	216,0	219,5	217,5	222,4	5,64	0,764	0,615	0,740	0,951
g MS/bolo	222,3	214,9	208,3	193,3	206,0	11,26	0,375	0,147	0,614	0,537
g FDN/bolo	401,5	393,4	401,5	362,0	388,9	0,57	0,659	0,213	0,605	0,668
g MS/h	121,8	118,9	145,5	148,2	136,2	3,53	0,028	0,018	0,130	0,016 ^A
g FDN/h	65,0	61,5	74,6	79,8	71,1	1,76	0,070	0,018	0,023	0,006 ^B

^AY= -1,0925 X² + 11,717 X + 120,38 (R² = 0,95)

^BY= -0,6479 X² + 6,9858 X + 61,625 (R² = 0,99)

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos diferentes aditivos e de níveis de APA sobre o consumo de proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), nutrientes digestíveis totais

(NDT), carboidratos não fibrosos (CNF) e energia metabolizável (EM) (Tabela 4). Esses resultados são considerados satisfatórios, uma vez que, segundo Azzaz et al. (2015) e Krehbiel (2014) a alteração no metabolismo ruminal pode ser ocasionada pela dieta e assim influenciar negativamente o consumo.

A literatura dispõe de poucos estudos referentes à monensina na alimentação de ovinos, mas uma meta-análise realizada por Duffield et al. (2012) mostrou que a inclusão desse ionóforo em uma faixa de 3 a 97,8 mg/kg MS nas dietas reduz o consumo de MS. Segundo Valdes et al. (2014), alguns metabólitos secundários, com substâncias e moléculas ativas, quando são liberadas no ambiente ruminal durante a fermentação, têm a capacidade de alterar a atividade microbiana no rúmen estimulando o apetite e a digestão, devido à sua atividade antimicrobiana direcionada para espécies bacterianas competidoras no rúmen.

A redução do consumo e da digestão não foi evidenciada nesse estudo, provavelmente porque MON foi adicionada no limite mínimo de concentração. Por outro lado, APA não provocou alterações no consumo e digestão da maioria dos componentes nutricionais mesmo nas concentrações superiores a 2,3 mg/kg, exceto para a digestibilidade de PB (DPB) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4. Consumo de nutrientes e energia metabolizável (EM) em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	MON 2,1	Níveis de APA (mg/kg MS)				EPM	MON vs APA 2,3	MON vs APA	Valor de P	
		0	2,3	4,6	9,2				L	Q
g/dia										
MS	1442	1471	1405	1424	1441	0,05	0,405	0,605	0,403	0,643
PB	189,0	173,4	179,3	173,9	170,8	0,00	0,352	0,107	0,279	0,145
EE	49,3	47,9	45,8	44,5	47,2	0,00	0,206	0,130	0,117	0,629
NDT	1112	1070	1130	1107	1064	0,05	0,331	0,770	0,699	0,231
FDN	705,4	694,1	677,2	664,4	705,4	0,03	0,412	0,412	0,272	0,909
CNF	560,3	601,9	577,7	598,7	601,4	0,02	0,554	0,192	0,428	0,177
g/kgPC^{0,75}										
MS	109,3	111,4	106,9	105,4	108,3	0,00	0,507	0,359	0,317	0,796
PB	14,4	13,1	13,7	12,8	12,9	0,00	0,354	0,065	0,214	0,076
EE	3,71	3,63	3,48	3,26	3,55	0,00	0,225	0,072	0,078	0,350
NDT	84,0	80,9	85,8	81,9	79,8	0,00	0,529	0,578	0,702	0,076
EM										
Kcal/kg PC	9,8	9,1	9,8	9,9	9,4	0,00	0,905	0,864	0,677	0,413
Kcal/kg PC ^{0,75}	22,8	21,9	22,9	23,1	22,0	0,00	0,978	0,705	0,719	0,280

A DPB apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$) com máxima digestibilidade no nível 4,5 mg/kg MS de APA na dieta (Tabela 5). Como não houve diferença entre MON

e APA (Tabela 5), entende-se que ambos agiram de forma similar no ambiente ruminal, dado também confirmado por Santos et al. (2013) que relataram ação inibitória dos alcaloides sobre bactérias gram-positivas. Porém o fato do percentual de concentrado na dieta (60%) ser a base de farelo de soja parece justificar melhor, uma vez que, houve melhoria da fermentação conforme discutido anteriormente.

Como o intervalo da dose de APA entre 4,6 a 5,6 mg/kg na dieta foi considerado anteriormente não letal para populações de bactérias gram-positivas na sua totalidade, pode-se inferir que isso também contribuiu para obtenção de ponto de máxima DPB dentro desta faixa porque diferentes proteinases produzidas por diferentes espécies podem agir sinergicamente (Wallace, 1985). Isso reforça a observação feita acima da DPB, uma vez que, muitas bactérias proteolíticas que não apresentam alta atividade desaminadora são gram-negativas, como *Butirivibrio fibrisolvens*, *Megasphaera elsdenii* e espécies de *Prevotella* e *Selenomonas* (Russell, 2002).

A proteólise ruminal é realizada pela ação de enzimas produzidas em microrganismos ruminais, por processos de hidrólise de proteínas, degradação de peptídeos e desaminação de aminoácidos. A qualidade da proteína dietética e a quantidade e o perfil de aminoácido devem ser equilibradas, a fim de que a proteólise não seja excessiva na formação de amônia para ser excretada na urina como ureia, em razão de que, as bactérias gram-negativas proteolíticas do rúmen não utilizam somente nitrogênio não proteico em sincronia com energia para seu processo de crescimento, mas também oligopeptídeos e aminoácidos (Bento et al., 2015; Valente et al., 2016).

Tabela 5. Digestibilidade de nutrientes em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	MON		Níveis de APA (mg/kg MS)				EPM	MON vs 2,3	Mon vs APA	Valor de P	
	2,1	0	2,3	4,6	9,2	L				Q	
Digestibilidade, g/100g											
MS	81,79	78,67	81,77	82,71	78,57	0,58	0,989	0,539	0,650	0,121	
PB	79,80	74,11	80,32	78,92	74,29	0,81	0,780	0,207	0,676	0,007 ^A	
EE	76,56	59,71	61,67	75,41	64,27	3,60	0,158	0,265	0,271	0,989	
NDT	76,76	72,60	76,40	77,70	73,70	0,72	0,824	0,541	0,812	0,224	
FDN	77,74	74,13	78,83	79,51	75,74	0,94	0,637	0,879	0,442	0,417	
CNF	90,58	90,09	90,63	91,12	88,91	0,54	0,975	0,799	0,797	0,448	

$$^A Y = -0,2682 X^2 + 2,4038 X + 74,683 \quad (R^2 = 0,87)$$

A proteólise no rúmen pode ser benéfica para o animal hospedeiro se os produtos forem transformados em proteína microbiana. Geralmente, a taxa de digestão de proteínas no rúmen excede a capacidade dos microrganismos incorporarem o

aminoácido liberado. Este desequilíbrio resulta em desaminação e perda de amônia através do rúmen, uma das principais causas de retenção ineficiente de nitrogênio (Valente et al., 2016).

A excreção urinária de nitrogênio (N) não foi influenciada pela dieta ($P > 0,05$). A eficiência do metabolismo nitrogenado em ruminantes depende da interação complexa de vários nutrientes e energia. O nitrogênio só é utilizado eficientemente pelos microrganismos quando a dieta proporciona equilíbrio de utilização de energia e proteína. Bactérias, fungos e protozoários são essenciais para digerir a fibra dietética (Bach et al., 2005; Hackmann & Firkins, 2015; Tas & Susenbeth, 2007), no entanto, estimular o crescimento desses reduz a necessidade de se utilizar excessos de proteína, porque a perda de nitrogênio na urina acaba não sendo viável em sistemas sustentáveis. Como as dietas foram formuladas para serem isonitrogenadas e isoenergéticas, não se observa esse efeito nas excreções de N na urina ($P > 0,05$) devido às possíveis modificações na fermentação com o uso dos aditivos (Pereira et al., 2017).

Tabela 6. Balanço de nitrogênio, síntese e eficiência microbiana em ovinos alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	MON	Níveis de APA (mg/kg MS)				EPM	MON vs 2,3	MON vs APA	Valor de P	
	2,1	0	2,3	4,6	9,2				L	Q
Nitrogênio, g/d										
Urina	7,22	8,35	7,51	10,05	8,73	0,94	0,920	0,534	0,666	0,340
Fezes	6,53	7,43	5,87	6,10	7,37	0,31	0,254	0,859	0,071	0,019 ^A
Ingerido (NI)	30,24	27,74	28,68	27,82	27,33	1,09	0,385	0,126	0,279	0,145
Digerido (ND)	23,71	20,32	22,82	21,71	19,96	0,92	0,592	0,117	0,559	0,055
Retido (NR)	16,50	11,97	15,30	11,66	11,23	0,99	0,659	0,101	0,433	0,038 ^B
Nitrogênio, %										
NR/NI	54,63	42,05	52,87	44,03	41,34	2,87	0,544	0,246	0,650	0,073
ND/NI	78,62	72,84	79,58	77,68	73,04	0,85	0,623	0,257	0,572	0,008 ^C
NR/ND	69,38	57,06	66,09	57,17	56,09	3,44	0,768	0,299	0,585	0,154
Produção microbiana, g/d										
Nitrogênio	11,21	10,69	10,69	6,07	7,97	0,58	0,691	0,015	0,165	0,003 ^D
PB	70,05	66,80	66,80	37,93	49,82	3,61	0,691	0,015	0,165	0,003 ^E
Eficiência microbiana										
g PB/kg NDT	66,38	63,68	63,11	34,46	50,44	4,07	0,701	0,028	0,166	0,008 ^F

$$^A Y = 0,0712X^2 - 0,6438X + 7,3056 (R^2 = 0,91)$$

$$^B Y = -0,0625X^2 + 0,3845X + 12,727 (R^2 = 0,33)$$

$$^C Y = -0,2779X^2 + 2,4791X + 73,524 (R^2 = 0,83)$$

$$^D Y = 0,1004X^2 - 1,3178X + 11,372 (R^2 = 0,63)$$

$$^E Y = 0,6275X^2 - 8,2363X + 71,061 (R^2 = 0,63)$$

$$^F Y = 0,7297X^2 - 8,7748X + 67,976 (R^2 = 0,60)$$

A excreção fecal de nitrogênio apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$), confirmando, a melhor digestibilidade da proteína no nível de 4,5 mg/kg MS de APA,

como resultado de ponto mínimo no mesmo nível. Não obstante, quando se observa o percentual de N digerido (ND) em razão ao NI, há também um efeito quadrático ($P < 0,05$) alcançando um ponto máximo no nível 4,5 mg/kg MS de APA (Tabela 6). Não houve diferença entre MON e APA sobre os parâmetros do balanço de nitrogênio ($P > 0,05$).

Esses dados também são reforçados pelo consumo de N (NI) que não foi alterado ($P > 0,05$) entre as dietas e, no balanço de nitrogênio, o nitrogênio retido (NR) ($P < 0,05$) foi máximo ao nível de 3,1 mg/kg MS de APA, aumento esse associado à maior DPB (Tabela 5) e provavelmente com redução de atividade de desaminação no rúmen. O balanço de N positivo demonstra o sincronismo entre o fornecimento de proteína e energia, indicando que as exigências dos animais foram atendidas (Tabela 6), porém, a maior retenção de N no nível 3,1 mg/kg de APA sugere que essa dose pode ter afetado a sobrevivência de bactérias que apresentam alta atividade de desaminação no rúmen, que é realizada por bactérias gram-positivas.

A produção microbiana (P_{mic}) apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$) estimando uma mínima produção no nível 6,6 mg/kg MS de APA. Para essa mesma variável, o contraste entre 2,1 mg/kg de MON e o nível 2,3 mg/kg de APA (Tabela 6) não mostrou diferença ($P > 0,05$), porém MON diferiu dos demais níveis de APA ($P < 0,05$), com maior valor de P_{mic} . A eficiência microbiana, como consequência da P_{mic} , seguiu a mesma variação quadrática ($P < 0,05$) com ponto mínimo no nível 6,0 mg/kg MS de APA. O contraste entre MON e o menor nível de APA não diferiu ($P > 0,05$), mas comparando-se com todos os níveis de APA observou-se maior eficiência microbiana com a utilização de MON (Tabela 6).

O fato de que a eficiência de ruminação (Tabela 3) tenha sido reflexo do APA provocar aumento da degradação e por consequência maior fermentação, corrobora a redução da síntese e eficiência microbiana na dose de 6,0 a 6,6 mg/kg MS de APA. Acima da dose de APA 6,6 mg/kg houve aumento da produção e eficiência microbiana, caracterizando o efeito dose-dependente de crescimento de populações microbianas no ecossistema do rúmen e de digestão no rúmen. A dose de APA que resultou em menores tempos nas atividades de ruminação de MS e de FDN e maior DPB coincide com a dose de APA que resultou em menor síntese de P_{mic} .

Esse efeito dose-dependente é consistente com o fato de que bactérias do rúmen apresentam relação inversa entre taxas de crescimento e de fermentação (degradação de substratos) (Russell, 1997), sendo assim, nas faixas em que o crescimento microbiano

reduziu a maior digestibilidade da proteína bruta ocasionada pela qualidade do concentrado pareceu compensar, uma vez que, o balanço de nitrogênio foi positivo (Tabela 6). Por outro lado, a retenção de N foi máxima no nível de APA 3,1 mg/kg, provavelmente, pelo maior suprimento de proteína microbiana metabolizável (Tabelas 5 e 6).

Os efeitos dose-dependentes são em geral não lineares, e a adição crescente de pequenas quantidades de um agente antimicrobiano pode ter seu efeito amplificado até que a dose letal seja atingida para eliminação de espécies competidoras num ecossistema (Macheboeuf et al., 2008). Como podemos constatar, o APA promove esse efeito dose-dependente sobre a digestão em ovinos, visto que, doses de APA 4,5 a 6,6 mg/kg de MS da dieta promovem menor tempo gasto com atividades de ruminação e menor síntese de proteína microbiana, e doses de 6,6 a 9,2 mg/kg promovem efeito oposto sobre essas variáveis. Essa melhoria na resposta poderia ser mal interpretada como uma interação sinérgica quando é simplesmente um efeito seletivo do agente quando a concentração limiar for atingida para causar morte de bactérias competidoras e assim favorecer o crescimento de bactérias resistentes.

CONCLUSÃO

Doses de 2,3 a 4,5 mg/kg MS de alcaloides piperidínicos de algaroba reduzem o tempo gasto com ruminação e podem ser utilizadas para reduzir a perda fecal de nitrogênio e aumentar a retenção de nitrogênio dietético em dietas balanceadas isonitrogenadas.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official methods of analysis (16th ed.), **Association of Official Analytical Chemists**. 1995.

AZZAZ, H.H.; MURAD, H.A.; MORSY, T.A. Utility of ionophores for ruminant animals: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, v.9, p.254-265, 2015.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.9-21, 2005.

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*)**. 1997. 189f. Thesis, University of Veterinary Medicine, Foundation Hannover, Hannover, Germany, 1997.

BENTO, C.B.P.; AZEVEDO, A.C.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H.C. Biochemical and genetic diversity of carbohydrate-fermenting and obligate amino acid-fermenting hyper-ammonia-producing bacteria from Nelore steers fed tropical forages and supplemented with casein. **BMC microbiology**, v.15, p.28, 2015.

BÜRGER, P.J.; PEREIRA, J.C.; SILVA, J.F.C.; VALADARES FILHO, S.C; QUEIROZ, A.C; CECON, P.R; MONTEIRO, H.C.F. Consumo e digestibilidade aparente total e parcial em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.206-214, 2000.

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 technical details. **International Feed Resources Rowett Research Institute**, Bucksburn, ABR, United Kingdom, 21, 1992.

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

DAWES, I.W.; SUTHERLAND, I.W. (2 ed.) **Microbial physiology**. 289p. 1992.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ., C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; AZEVEDO, J.A.G. Métodos para análise de alimentos - INCT. **Ciência Animal**. Editora Suprema. 2012.

DUFFIELD, T.F.; MERRILL, J.K.; BAGG, R.N. Meta-analysis of the effects of monensin in beef cattle on feed efficiency, body weight gain, and dry matter intake. **Journal of Animal Science**, v. 90, p.4583-4592, 2012.

DURMIC, Z.; BLACHE, D. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. **Animal Feed Science and Technology**, v.176, p.150-162, 2012.

HACKMANN, T.J.; FIRKINS, J.L. Maximizing efficiency of rumen microbial protein production. **Frontiers in microbiology**, v.6, p.465, 2015.

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

HENCIYA, S.; SETURAMAN, P.; JAMES, A.R.; TSAI, Y.H.; NIKAM, R.; WU, Y.C.; DAHMS H-U.; CHANG, F.R. Biopharmaceutical potentials of *Prosopis* spp. (Mimosaceae, Leguminosa). **Journal of Food and Drug Analysis**, v.25, p.187-196, 2017.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.D.G.; RAMOS, C. L.; ÍTAVO, L.C.V.; TOMICH, T.R.; SILVA, J.A.D. Green propolis extract as additive in the diet for lambs in feedlot. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.1991-1996, 2011.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; COSTA, C.; ÍTAVO, L.C.V.; FRANCO, G.L.; DA SILVA, J.A.; REIS, F.A. Addition of propolis or monensin in the diet: behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal and Feed Science and Technology**, v.165, p.161-166, 2011.

KREHBIEL, C.R. Invited Review: Applied nutrition of ruminants: Fermentation and digestive physiology. **The Professional Animal Scientist**, v.30, p.129-139, 2014.

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.

MACHEBOEUF, D., MORGAVI, D. P., PAPON, Y., MOUSSET, J. L., ARTURO-SCHAAN, M. Dose–response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. **Animal Feed Science and Technology**, v.145, p.335-350, 2008.

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

MICKDAM, E.; KHIAOSA-ADR, R.; METZLER-ZEBELI, B.; KLEVENHUSEN, F.; CHIZZOLA, R.; ZEBELI, Q. Rumen microbial abundance and fermentation profile during severe subacute ruminal acidosis and its modulation by plant derived alkaloids *in vitro*. **Anaerobe**, v.39, p 4-13, 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th ed). **National Academies Press**. 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. **National Academies Press**. 2007.

NIKKHAH, A. Ruminant feed intake regulation evolution: chronophysiological rhythms perspectives. **Biological Rhythm Research**, v.45, p.563-577, 2014.

PATRA, A.K.; SAXENA, J. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.96, p.363-375, 2009.

PERAZZO, A.F; HOMEM NETO, S.P; RIBEIRO, O.L; SANTOS, E.M; CARVALHO, G.G.P; OLIVEIRA, J.S; RODRIGUES, T.C.G.C.; PINHO, R.M.A. Correlations of intake, digestibility and performance with the ingestive behavior of lambs fed diets containing ammoniated buffel grass hay. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.1551-1563, 2016.

PERAZZO, A.F; HOMEM NETO, S.P; RIBEIRO, O.L; SANTOS, E.M; CARVALHO, G.G.P; OLIVEIRA, J.S; BEZERRA, H.F.C; CAMPOS, F.S; FREITAS JÚNIOR, J.E. Intake and ingestive behavior of lambs fed diets containing ammoniated buffel grass hay. **Tropical Animal Health and Production**, v.49, p.717-724, 2017.

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.

PETRI, R.M; MICKDAM, E.; KLEVENHUSEN, F.; BEYER, B.; ZEBELI, Q. Effects of the supplementation of plant-based formulations on microbial fermentation and predicted metabolic function *in vitro*. **Anaerobe**, 2019.

PREETI, K.; AVATAR, S.R.; MALA, A. Pharmacology and therapeutic application of *Prosopis juliflora*: A review. **Journal of Plant Sciences**, v.3, p.234-240, 2015.

RUSSELL, J.B.; WALLACE, R.J. Energy yielding and energy-consuming reactions. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**, p.246-282, 1997.

RUSSELL, J. B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**, Ithaca, NY: James B. Russell, 119p. 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; BARBOSA, 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 Sciences**, v.14, p.8496-8516, 2013.

SANTOS, J.R.A. **Extrato alcaloídico da farinha de vagens integrais de algarobeiras em dietas para cordeiros confinados**. 2017. 77f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil. 2017.

SAS (2006). *User's guide: Statistics*, version 9.1 edition. Cary, NC, USA: **Statistical Analysis Systems Institute**.

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

SILVA, C.S.; SOUZA, E.J.O.; PEREIRA, G.F.C; CAVALCANTI, E.O; LIMA, E.I.M; TORRES, T.R; SILVA, J.R.C; SILVA, D.C. Plant extracts as phytogetic additives considering intake, digestibility, and feeding behavior of sheep. **Tropical animal health and production**, v.49, p.353-359, 2017.

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.

SONI, L.K.; DOBHAL S.; PARASHER, P.; DOBHAL M.P. Phytochemicals From *Prosopis Species*. **International Journal of Environment, Science and Technology**, v.4, p.9-32, 2018.

SOUSA, L.B. **Alcaloides piperidínicos de *Prosopis juliflora* como aditivo nutricional para cordeiros**. 2018. 57f. Dissertação. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil. 2018.

TAJODINI, M; MOGHBELI, P.; SAEEDI, H.R.; EFFATI, M. The Effect of Medicinal Plants as a Feed Additive in Ruminant Nutrition. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.4, 2014.

TAS, B.M.; SUSENBETH, A. Urinary purine derivates excretion as an indicator of *in vivo* microbial N flow in cattle: A review. **Livestock Science**, v.111, p.181-192, 2007.

VALDES, K.I., SALEM, A.Z.M., LÓPEZ, S., ALONSO, M.U., RIVERO, N., ELGHANDOUR, M.M.Y., DOMÍNGUEZ, I.A; RONQUILLO, M.G; KHOLIF, A.E. Influence of exogenous enzymes in presence of *Salix babylonica* extract on digestibility, microbial protein synthesis and performance of lambs fed maize silage. **The Journal of Agricultural Science**, v.153, p.732-742, 2015.

VALENTE, T.N.P.; LIMA, E.S.; SANTOS, W.B.R.; CES&ARIO, A.E.S.; TAVARES, C.A.J.; FREITAS, M.A.M. Ruminant microorganism consideration and protein used in the metabolism of the ruminants: A Review. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, p.456-464, 2016.

WALLACE, R.J.; BRAMMALL, M.L. The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. **Microbiology**, v.131, p.821-832, 1985.

WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, Ithaca. Proceedings... Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.

V – CAPÍTULO II

**CREATININA E TEMPOS DE COLETA DE URINA PARA
ESTIMAR A EXCREÇÃO DE DERIVADOS DE PURINA EM
OVINOS ALIMENTADOS COM ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS
DE ALGAROBA**

RESUMO

Objetivou-se avaliar os efeitos de dietas aditivadas com níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA: 0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg de MS) em comparação com monensina (MON: 2,1 mg/kg MS) sobre a depuração e excreção de creatinina e avaliar diferentes tempos de coletas (4, 8, 12, 16, 20 e 24 h) em amostras de coleta *spot* de urina e de urina total acumulativa em comparação com urina total de 24 h (U24) para estimar a excreção derivados de purina (DP) e obtenção da razão de concentração de derivados de purina por creatinina (índice DPC). Utilizou-se 400 g de feno de Tifton 85 e 600 g de concentrado por kg de MS da dieta. Foram utilizados 5 cordeiros Dorper x Santa Inês, machos não castrados, confinados em gaiolas metabólicas com idade aproximada de 120 dias e peso corporal médio inicial de $21,05 \pm 0,54$ kg e peso médio final $41,03 \pm 2,74$ kg. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino 5 x 5, durante 95 dias, sendo 14 dias de adaptação e 5 dias de coleta. O volume urinário foi afetado de forma linear decrescente pelas dietas ($P < 0,05$), mas não diferiu entre MON e APA ($P > 0,05$). Não houve alterações na depuração de creatinina, excreção diária de creatinina e concentração de creatinina no plasma ($P > 0,05$). A excreção de DP e o índice DPC variaram de forma quadrática com pontos mínimos de 6,9 e 5,6 mg/kg MS de APA, respectivamente ($P < 0,05$). A excreção de DP utilizando as amostragens de coleta *spot* de urina e total acumulativa estimada com o volume urinário observado (urina total 24 h) variou entre dietas e tempo de coleta ($P < 0,05$). A excreção diária de creatinina extrapolada pela urina total acumulativa e o volume de urina estimado utilizando o valor médio de 16,10 mg/kg PC não variaram ($P > 0,05$) entre as dietas, tempo de coleta e a interação entre dieta x tempo não foi significativa. O volume urinário estimado não diferiu ($P > 0,05$) entre as dietas, tempo de coleta de urina *spot* e interação dieta x tempo ($P > 0,05$). O índice DPC para urina *spot* foi diferente entre dietas ($P < 0,05$), mas sem efeito de tempo e interação ($P > 0,05$). Não se constatou diferenças entre dietas para índice DPC para urina total acumulativa e interação entre dieta x tempo ($P > 0,05$) com efeito de tempo de duração de coleta ($P < 0,05$). A creatinina não é afetada pelos níveis de APA e pode ser usada para estimar o volume urinário em coleta *spot* de urina coletadas nos tempos de 4, 8 e 12 h após alimentação da manhã. Creatinina em amostras de urina total acumulativa não é adequada para estimar o volume urinário e para obter o índice DPC.

Palavras-chave: *spot*, urina total, índice DPC

* Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-orientador: Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

V - CHAPTER II

**CREATININE AND URINE COLLECTION TIME TO ESTIMATE
THE EXCRETION OF PURINE DERIVATIVES IN SHEEP FED
WITH MESQUITE PIPERIDINE ALKALOIDS**

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of additive diets with piperidine alkaloids levels (APA: 0, 2.3, 4.6 and 9.2 mg/kg DM) compared to monensin (MON: 2.1 mg/kg DM) on creatinine clearance and excretion and evaluate different collection times (4, 8, 12, 16, 20 and 24 h) in urine and total urine collection sites compared to 24-h total urine (U24) to estimate purine derivatives (PD) excretion and to obtain the ratio of purine derivatives to creatinine (PDC index). 400 g of Tifton 85 hay and 600 g of concentrate per kg of diet MS were used. Five male Dorper x Santa Inês lambs were used, which were housed in metabolic cages with an approximate age of 120 days and an average initial body weight of 21.05 ± 0.54 kg and an average final weight of 41.03 ± 2.74 kg. The animals were distributed in a 5 x 5 latin square design for 95 days, with 14 days of adaptation and 5 days of collection. The urinary volume was affected linearly decreasing by the diets ($P < 0.05$), but did not differ between MON and APA ($P > 0.05$). There were no changes in creatinine clearance, daily creatinine excretion and plasma creatinine concentration ($P > 0.05$). The excretion of PD and the PDC index varied in a quadratic manner with minimum points of 6.9 and 5.6 mg/kg DM of APA, respectively ($P < 0.05$). The excretion of PD using urine *spot* sampling and cumulative total estimated with observed urine volume (total urine 24 h) varied between diets and collection time ($P < 0.05$). The daily excretion of creatinine extrapolated by cumulative total urine and estimated urine volume using the mean value of 16.10 mg/kg BW did not vary ($P > 0.05$) between diets, collection time and the interaction between diet x time was not significant. Estimated urinary volume did not differ ($P > 0.05$) between diets, time of *spot* urine collection and diet x time interaction ($P > 0.05$). The PDC index for *spot* urine was different between diets ($P < 0.05$), but with no effect of time and interaction ($P > 0.05$). There were no differences between diets for PDC index for cumulative total urine and interaction between diet and time ($P > 0.05$) with effect of duration of collection ($P < 0.05$). Creatinine is not affected by APA levels and can be used to estimate urine volume in *spot* urine at 4, 8 and 12 h after morning feeding. Creatinine in cumulative total urine samples is not adequate to estimate urinary volume and to obtain the PDC index.

Key words: *spot*, total urine, PDC index

* Adssiver: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, Dr. UESB e Co-adssiver: Herymá Giovane de Oliveira Silva, Dr. UESB.

INTRODUÇÃO

A excreção urinária de derivados de purina (DP) é uma técnica difundida para estimação da síntese de proteína microbiana no rúmen, por apresentar uma metodologia que requer coleta de urina, o que torna mais acessível por não necessitar de intervenções cirúrgicas. O princípio da técnica de DP baseia-se na premissa de que os ácidos nucleicos microbianos fluem do rúmen e são digeridos no intestino produzindo bases purinas que são absorvidas, contribuindo por uma fração dos derivados de purina (DP) excretados na urina e refletindo de forma precisa a síntese de proteína microbiana ruminal (Chen & Gomes, 1992; Bezerra et al., 2010; Kozloski et al., 2017).

Inicialmente, excreção urinária de DP era mensurada apenas por coleta de urina total 24 h durante três dias ou mais, contudo, em algumas situações quando isso não era possível, Chen & Gomes (1992) asseguraram que uma única amostra pontual de urina, realizada em qualquer horário, corrigindo-se pela creatinina, reflete a quantidade total de metabólitos excretados durante um período de 24 h.

Entretanto, a perfusão sanguínea e a fração de filtração pelos glomérulos renais podem sofrer alterações circadianas endógenas adaptativas ou até mesmo das dietas ofertadas, provocando, respectivamente, variações na concentração de creatinina ou na sua excreção diária corrigida para peso corporal (Pereira et al., 2013; Santos et al., 2013). Dessa forma, a utilização de creatinina como indicador da excreção de DP utilizando amostra de urina coletada em um único ponto de tempo não seria universalmente adequada, podendo comprometer a precisão da técnica (Pereira, 2015).

A aplicação de metodologias de coletas de urina tem sido avaliada em bovinos (Barbosa et al., 2006; Chizzotti et al., 2008; George et al., 2006; Leal et al., 2007; Júnior et al., 2018), em ovinos e caprinos (Santos et al., 2018), com objetivo de substituir a coleta de urina total de 24 h e de tornar o método aplicável em grandes grupos de animais.

Em bovinos, não se observa diferenças entre a excreção diária de creatinina em diversos dias, tempos de coleta e dieta (Barbosa et al., 2006; Chizzotti et al., 2008; Leal et al., 2007), mas para estimar a excreção de DP, enquanto Júnior et al. (2018) recomendaram coleta de urina *spot* em qualquer horário do dia, George et al. (2006) revelaram que uma amostragem 6 h após a alimentação não é adequada para detectar diferenças.

Em ovinos, poucos dados referentes a tempos de coleta são relatados. Para excreção de creatinina, Pereira (2015) encontrou diferenças influenciadas pela da dieta e que o nível de ingestão de matéria seca (MS) é o fator principal causador dessa alteração, mas em contrapartida, Santos et al. (2018) relatou que a excreção de creatinina não é influenciada pela ingestão de MS ou matéria orgânica. Para estimar as excreções de DP em alternativa a coleta total de 24 horas, os horários de 3 e 4 horas após a alimentação em coleta *spot* são recomendadas por Santos et al. (2018) e Pereira (2015) respectivamente para ovinos.

Para aumentar a precisão do método, Pereira (2015) sugeriu que, pode-se realizar coleta de urina total de 24 h pelo menos de um indivíduo em cada dieta experimental para obtenção da excreção diária de creatinina e assim, estimar a excreção de DP determinada na amostra de urina *spot*. O objetivo nesse estudo foi avaliar os efeitos de dietas com níveis de inclusão de alcaloides piperidínicos de algaroba (0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg de MS) em comparação com monensina (2,1 mg/kg MS) sobre a depuração e excreção de creatinina e avaliar diferentes tempos de coletas (4, 8, 12, 16, 20 e 24 h) em amostras de urina *spot* e de urina total acumulativa em comparação com urina total de 24 h (U24) para estimar a excreção derivados de purina (DP) e obtenção da razão de concentração de derivados de purina por creatinina (índice DPC).

MATERIAL E MÉTODOS

Local, animais e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no setor de ovinos e caprinos (SETOC), na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *Campus* Juvino Oliveira, Itapetinga-BA. A aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) está sob Protocolo nº 23/2013.

Foram utilizados 5 cordeiros Dorper x Santa Inês, machos não castrados, confinados em gaiolas metabólicas com idade aproximada de 120 dias e peso médio inicial de $21,05 \pm 0,54$ kg e peso médio final $41,03 \pm 2,74$ kg. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino 5 x 5, durante 95 dias, sendo 14 dias de adaptação e 5 dias de coleta.

Dietas experimentais

As dietas foram balanceadas mediante estimativa de exigências, conforme equações do NRC (2007), considerando ganho de peso diário de 200 g; com 75% de digestibilidade de MS e 40% de proteína degradável no rúmen e o consumo de água foi *ad libitum*. As dietas experimentais consistiram na adição de monensina sódica (2,1 mg/kg MS) e nos níveis de adição de APA (0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg MS).

As proporções dos ingredientes da dieta e composição química do volumoso e concentrado estão na Tabela 1.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes da dieta e composição química do feno de Tifton 85 e concentrado.

Ingredientes	Dieta experimental (g/kg MS)	
	Feno de Tifton 85	Concentrado
Feno de Tifton 85	400	
Farelo de milho	450	
Farelo de soja	130	
Sal Mineral ^A	15	
Ureia	4	
Energia Metabolizável (MJ/kg MS)	9,7	
Nutrientes (g/kg MS)	Feno de Tifton 85	Concentrado
Matéria seca	855,1	882,2
Matéria orgânica	922,2	960,3
Proteína bruta	70,9	167,0
Proteína insolúvel em detergente neutro	47,7	130,5
Proteína insolúvel em detergente ácido	40,2	57,3
Extrato etéreo	36,0	21,0

Carboidratos totais	820,3	703,5
Carboidratos não fibrosos	44,7	237,7
Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína	775,6	465,8
Hemicelulose	134,4	278,7
Celulose	561,6	181,0
Lignina	132,0	25,5
Nutrientes digestíveis totais	391,2	722,3

^ASal Mineral = composição: 120 g Ca/kg, 87 g P/kg, 147 g Na/kg, 18 g S/kg, 590 mg Cu/kg, 40 mg Co/kg, 20 mg Cr/kg, 1.8 g Fe/kg, 80 mg I/kg, 1.3 g Mn/kg, 15 mg Se/kg, 3.8 g Zn/kg, 300 mg Mo/kg, 870 mg F/kg (máx.), de solubilidade do fósforo (P) em ácido cítrico a 2% (mín.) – 95%.

As dietas foram fornecidas diariamente às 07h00min e 15h00min, *ad libitum*, de forma a permitir 10% do fornecimento em sobras. Entretanto, o consumo voluntário diário foi calculado pela diferença entre a dieta total oferecida e as sobras colhidas e pesadas duas vezes ao dia.

Coletas e análises laboratoriais

Urina

Após o fornecimento da alimentação, as coletas urinárias realizadas através de micção espontânea dos animais foram realizadas do 18º ao 19º dia de cada período experimental. Três tipos de coletas foram realizadas:

I) Urina spot (em intervalos de 4 horas ao longo de um período de 24 horas)

Na coleta *spot* usaram-se sacos coletores no prepúcio de cada animal em horários pontuais (4, 8, 12, 16, 20 e 24). Pesava-se e alíquotas de 10 mL das amostras obtidas com as coletas por amostragem, foram diluídas em 40 mL de H₂SO₄ a 0,018M, devidamente identificadas, armazenadas a -20°C, para posteriores análises. Ao final do período de 24 horas, o volume coletado das amostragens foi considerado para obtenção do volume diário de urina.

II) Urina total acumulativa (ao longo de um período de 24 horas)

Um balde coletor foi posicionado abaixo de cada gaiola metabólica, a fim de acumular o volume de urina produzido. A cada quatro horas de duração de coleta (4, 8, 12, 16, 20 e 24) pesava-se a urina excretada e retirava-se uma alíquota de 10 mL de cada horário. A urina total produzida em cada horário foi sendo acumulada sob

refrigeração até obtenção da urina total de 24 h para ser acidificada. As alíquotas de 10 mL de urina foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 0,018M), devidamente identificadas, armazenadas a -20°C , para posteriores análises. Ao final do período de 24 h de coletas, o volume de urina total foi mensurado a partir dos volumes de urina excretada nos intervalos de 4 h.

III) *Urina total de 24 horas*

O volume de urina produzida durante o dia foi acumulado, resfriado e acidificado em recipiente. Foram adicionados 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 0,018M) a 20%, e ao final da coleta, pesada, homogeneizada e filtrada em gaze, retirando uma alíquota de 10% do volume, prontamente identificadas e armazenadas a -20°C , para posteriores análises.

As amostras foram elaboradas com pH ácido (< 3) para evitar a destruição bacteriana dos metabólitos presentes na urina e destinadas à quantificação das concentrações urinárias de creatinina, alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina, bem como para mensuração do volume urinário diário.

A excreção de derivados de purinas totais (DP) foi obtida pela soma das quantidades de alantoína, ácido úrico e xantina-hipoxantina excretadas na urina (mmol/L).

A depuração de creatinina (mL/min) foi obtida através da fórmula:

$$[(\text{CCU} \times \text{VU})/\text{CCP}] \times (1000/1440)$$

Onde CCU é a concentração de creatinina na urina (mg/dL); VU é o volume urinário em 24 horas; CCP é a concentração de creatinina no plasma (mg/dL) multiplicados pela razão (1000/1440) para obter a filtração por unidade de tempo.

A razão da concentração de derivados de purina/creatinina (índice DPC) em mg/L foi calculado de acordo a equação descrita por Chen et al. (2004):

$$\text{Índice DPC} = (\text{DP}/\text{CCU}) \times \text{PC}^{0,75}$$

O volume urinário estimado a partir das amostras de coleta *spot* foi calculado pela excreção diária média de creatinina (22,8 mg/kg PC), encontrada no ensaio de coleta de urina total, dividida pela concentração (mg/L) na amostra de coleta *spot* e multiplicando-se pelo peso corporal médio dos animais.

O volume urinário estimado a partir das amostras de urina total acumulativa foi calculado pela excreção média de creatinina (16,1 mg/kg PC), encontrada pela

extrapolação do volume urinário e concentração (mg/L) de creatinina a cada horário das mesmas amostras, dividindo-se pelo peso corporal médio dos animais.

Plasma

Quatro e doze horas após o fornecimento da dieta da manhã, no 18º dia de cada período experimental, realizou-se a coleta de sangue, via punção da veia jugular, utilizando-se tubo de ensaio (*Vacutainer*®) de 5 mL com EDTA. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos, obtendo-se os plasmas sanguíneos, que foram armazenados a -20°C, para posterior análise de creatinina utilizando uma amostra composta dos dois horários através de *kit* comercial (*Bioclin*®).

A concentração de creatinina plasmática foi utilizada para obter a depuração de creatinina como indicador da taxa de filtração glomerular.

Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada pelo procedimento geral de modelos lineares (PROC GLM) do programa computacional estatístico SAS (SAS, 2006). Realizou-se contraste entre monensina vs 2,3 mg/kg de MS de APA e monensina vs 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg de MS de APA, bem como contrastes polinomiais para os componentes linear (L) e quadrático (Q) na análise de médias das variáveis dependentes em função dos níveis de APA. Adotou-se como nível de significância 5% de probabilidade.

O modelo matemático utilizado para avaliar a concentração, excreção e depuração de creatinina, concentração e excreção de derivados de purina e índice DPC (Derivados de purina:creatinina) foi:

$$Y_{ij}(k) = \mu + per_i + An_{ij} + \tau(k) + \varepsilon_{ij}(k) \quad i, j, k = 1, \dots, r$$

Onde:

$Y_{ij}(k)$ = observação $ij(k)$

μ = média geral

Per_i = o efeito do período i

An_{ij} = o efeito do animal j

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

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

r = número de tratamentos, período e animal

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume urinário foi afetado de forma linear decrescente pelas dietas ($P < 0,05$), mas não diferiu entre MON e APA (Tabela 2). A variação no volume urinário pode ser resultado da maior ingestão de água, no entanto, não houve alteração da excreção de creatinina relativa ao peso corporal em função das dietas (Tabela 2). Naqvi et al. (2015) relataram que mesmo havendo privação de água durante 48 h, a excreção de creatinina em cordeiros pode ser alterada se houver uma deficiência de nitrogênio juntamente com o nível de desidratação, porque esta condição afeta a taxa de filtração glomerular (TFG). Consistentemente, foi observado um baixo coeficiente de determinação para a equação que relaciona o volume urinário com os níveis de APA nas dietas isonitrogenadas (Tabela 2).

Tabela 2. Média e erro padrão da média (EPM) em coleta de urina de 24 horas e concentração plasmática de creatinina em cordeiros alimentados com dietas contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

Item	MON	Níveis de APA				EPM	MON vs APA 2,3	MON vs APA	Valor de P	
	2,1	0	2,3	4,6	9,2				L	Q
Urina										
(L/dia)	1,05	1,05	1,34	1,33	1,00	0,06	0,050	0,148	0,009 ^A	0,269
Depuração de Creatinina										
mL/min	5,13	4,89	5,45	6,07	5,77	0,80	0,866	0,670	0,763	0,672
mL/kg PC ^{0,75}	0,41	0,38	0,40	0,50	0,45	0,07	0,936	0,790	0,924	0,633
Excreção diária de creatinina										
mg/kg PC	21,75	24,22	24,78	22,43	20,81	1,01	0,139	0,566	0,157	0,147
mg/kg PC ^{0,75}	50,88	57,10	58,37	52,79	48,49	2,24	0,131	0,546	0,143	0,141
Concentração de creatinina no plasma										
mg/dL	0,48	0,57	0,66	0,52	0,44	0,52	0,064	0,855	0,080	0,091
Excreção diária de derivados de purina										
mmol	13,37	12,84	13,04	8,03	9,78	0,62	0,817	0,018	0,226	0,002 ^B
mmol/kg PC ^{0,75}	1,04	0,98	1,00	0,60	0,78	0,05	0,692	0,015	0,156	0,003 ^C
Índice DPC										
	31,85	25,62	25,39	17,37	23,15	1,51	0,122	0,009	0,023	0,032 ^D

$$^A Y = -0,0129 X + 1,232 \quad (r^2 = 0,0793)$$

$$^B Y = 0,0962 X^2 - 1,3255 X + 13,587 \quad (R^2 = 0,6173)$$

$$^C Y = 0,0084 X^2 - 0,1081 X + 1,0411 \quad (R^2 = 0,5713)$$

$$^D Y = 0,2344 X^2 - 2,604 X + 26,852 \quad (R^2 = 0,5804)$$

O melhor indicador da função renal é a TFG, embora não seja medida diretamente, pode ser avaliada pela técnica de depuração usando creatinina plasmática e urinária (Kamili et al., 2013). No entanto, não houve alterações na depuração de creatinina, excreção diária de creatinina e concentração de creatinina no plasma ($P > 0,05$) (Tabela 2). O valor médio de excreção de creatinina (22,8 mg/kg PC) foi próximo

ao valor encontrado em uma revisão realizada por Kozloski et al. (2005) de 23,2 mg/kg PC para ovinos adultos da raça Texel x Ideal.

A excreção diária de derivados de purina (DP) variou de forma quadrática ($P < 0,05$), atingindo ponto mínimo na concentração de 6,9 mg/kg de APA na dieta. E o contraste entre os aditivos mostrou que DP excretados para a dieta contendo MON foram superiores ao APA (Tabela 2). Esses dados refletiram na síntese microbiana, que nesse estudo, apresentaram efeito dose-dependente de crescimento da microbiota ruminal variando de forma quadrática, com mínima produção em 6,6 mg/kg de APA.

Em ruminantes, a maior parte dos DP excretados na urina vem do metabolismo parcial do ácido nucleico microbiano absorvido no duodeno (Saeed et al., 2018). A média de excreção diária de DP foi 0,88 mmol/kg PC^{0,75}, próxima do valor encontrado por Kozloski et al. (2017) de 0,72 mmol/kg PC^{0,75} em ovinos fistulados, uma vez que os mesmos autores inferiram que o fluxo de proteína microbiana que flui para o duodeno possui alta correlação com a excreção de DP.

A razão entre as concentrações de derivados de purina e creatinina (índice DPC) pode ser utilizado como um indicador nutricional devido à sua relação com a ingestão de matéria orgânica e excreção urinária de DP, mas é dependente da eficiência de síntese microbiana, podendo variar entre dietas (David et al., 2015) enquanto a excreção de creatinina não varia (Pereira et al., 2013).

O índice DPC leva em consideração o peso metabólico do animal, para facilitar a comparação entre animais de diferentes pesos corporais, então é possível que seja eficiente em detectar diferenças entre as dietas. Como consequência da variação na excreção de DP e não de creatinina, o índice DPC também apresentou variação quadrática ($P > 0,05$) com ponto mínimo no nível APA 5,6 mg/kg e a dieta MON mostrou maior índice DPC comparada à dieta com APA (Tabela 2).

A excreção de DP utilizando a metodologia de coleta *spot* de urina estimada com o volume urinário observado¹ diferiu entre dietas e tempo de coleta ($P < 0,05$), mas não houve interação significativa entre dieta x tempo (Tabela 3). Para os tempos de coleta, os horários 20 e 24 foram diferentes de U24. Os valores de DP médios obtidos foram superestimados devido a inclusão desses tempos de coleta nos cálculos e estimada excreção mínima na dose de APA de 5,4 mg/kg, que numericamente foi menor a observada com U24 (Tabela 2).

Como a excreção diária de creatinina não foi influenciada pelas dietas, e constatou-se que não houve alterações na depuração de creatinina (Tabela 2), foi

utilizada a média (22,8 mg/kg PC) para obter o volume urinário estimado utilizando amostras urinárias em intervalos de 4 horas após alimentação da manhã (coleta *spot*) e urina total (coleta total acumulativa a cada intervalo de 4 horas) e conseqüentemente a excreção de derivados de purina nessas amostras especificadas acima que estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

O índice DPC para coleta *spot* foi diferente entre dietas ($P < 0,05$), porém não foi detectado efeito de tempo e interação ($P > 0,05$) (Tabela 3), indicando a possibilidade de utilização de qualquer horário para amostragem de urina para determinação de concentração de DP e de creatinina. No entanto, os valores de índice PDC foram superestimados, devido aos menores valores de concentração de creatinina na amostra *spot* quando comparados com aqueles na urina total (U24) (Tabela 5). Essas menores concentrações de creatinina na urina *spot* foram responsáveis por superestimar os volumes de urina e, conseqüentemente, as excreções de DP (Tabela 3).

Tabela 3. Volume de urina, excreção de derivados de purina e índice DPC em amostras de coleta *spot* coletadas em intervalos de 4 horas após a alimentação matinal (T) e coleta de urina total de 24 h (U24) em cordeiros alimentados com dietas (D) contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	Níveis de APA (mg/kg MS)					EPM	D	Tempo de coleta (h)						EPM	T	D x T	
	MON	2,1	0	2,3	4,6			9,2	4	8	12	16	20				24
Volume urina (L/d)																	
Observado	1,05	1,05	1,34	1,33	1,00	0,06	0,043 ^A	-	-	-	-	-	-	1,15	-	-	-
Estimado	1,11	1,10	1,49	1,52	1,27	0,07	0,178	1,42	1,58	1,41	1,35	1,15	1,02	1,15	1,30	0,370	0,986
Derivados de purina (mmol/d)																	
Observado	17,90	15,52	13,28	11,73	13,77	0,72	0,044 ^B	12,24	9,12	13,77	14,50	19,09*	20,96*	11,41	0,72	<.0001 ^a	0,988
Estimado	17,46	17,00	12,69	14,65	21,06	0,85	0,011 ^C	14,28	16,31	17,75	18,38	19,60	18,28	11,41	16,57	0,075	0,626
Índice DPC																	
Urina <i>spot</i>	48,92	42,39	25,49	29,68	45,41	2,45	0,003 ^D	38,56	37,57	42,53	48,44	39,46	37,42	24,67	2,45	0,177	0,915

^AY = -0,0129X + 1,232 (r² = 0,08);

^BY = 0,1312X² - 1,4091X + 15,604 (R² = 0,99);

^CY = 0,2421X² - 1,7211X + 16,555 (R² = 0,94);

^DY = 0,7921X² - 6,7385X + 40,865 (R² = 0,90);

^aY = 0,0276X² - 0,2419X + 11,641 (R² = 0,89)

Tabela 4. Volume de urina, excreção de derivados de purina, excreção diária de creatinina e índice DPC em amostras de coleta total acumulativa, coletadas em intervalos de 4 horas após a alimentação matinal (T) e coleta de urina total de 24 h (U24) em cordeiros alimentados com dietas (D) contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	Níveis de APA (mg/kg MS)					EPM	D	Tempo de coleta (h)							EPM	T	D x T
	MON	2,1	0	2,3	4,6			9,2	4	8	12	16	20	24			
Volume de urina (L/d)																	
Observado	1,05	1,05	1,34	1,33	1,00	0,06	0,043 ^A	-	-	-	-	-	-	1,15	-	-	-
Estimado ¹	1,25	1,16	1,30	1,48	1,36	0,06	0,610	1,03	1,49	1,34	1,23	1,40	1,52	1,15	0,06	0,367	0,895
Estimado ²	1,71	1,58	1,76	2,01	1,87	0,09	0,613	1,46	2,11*	1,89	1,74	1,98	2,15*	1,15	0,09	0,034 ^a	0,876
Urina total 4-4 ⁵	634,7	693,8	904,9	913,5	670,4	54,4	0,053	130,4*	429,7*	630,4*	865,6	1010,7	1124,1	1153,3	54,4	<.0001 ^b	1,000
Excreção diária de creatinina (mg/kg/PC)																	
Estimada ¹	15,95	16,86	14,57	16,16	16,96	1,21	0,972	12,56	16,68	17,58	18,14	13,73	11,21	22,80	1,21	0,166	0,747
Derivados de purina (mmol/d)																	
Observado	16,32	14,89	14,88	12,35	13,94	0,51	0,034 ^B	21,11*	13,91	13,92	13,01	13,51	14,46	11,41	0,51	<.0001 ^c	0,998
Estimado ¹	19,15	18,39	18,51	19,72	21,34	1,11	0,898	20,76	20,01	21,07	16,47	23,44*	22,77*	11,41	1,11	0,035 ^d	0,479
Estimado ²	26,33	25,28	25,44	27,44	29,64	1,60	0,894	29,40*	28,34*	29,84*	23,33	33,20*	32,25*	11,41	1,60	0,004 ^e	0,615
Índice DPC																	
Urina total	54,58	89,59	65,76	79,01	83,89	6,38	0,399	69,67	77,23	74,20	105,1*	92,22*	78,87	24,67	6,38	0,040 ^f	0,807

^AY = -0,0129X + 1,232 (r² = 0,08);

^BY = 0,0671X² - 0,7764X + 15,278 (R² = 0,57);

^aY = -0,0006X² + 0,0383X + 1,504 (R² = 0,38);

^bY = 49,619X + 3,8133 (R² = 0,98);

^cY = 0,0477X² - 1,5873X + 25,641 (R² = 0,86);

^dY = 0,0268X² - 0,6388X + 23,186 (R² = 0,34);

^eY = 0,038X² - 0,904X + 32,833 (R² = 0,34);

^fY = -0,1607X² + 5,3689X + 46,703 (R² = 0,52).

A excreção de DP utilizando a metodologia de coleta *spot* de urina estimada com o volume urinário observado diferiu entre dietas e tempo de coleta ($P < 0,05$), mas não houve interação significativa entre dieta x tempo (Tabela 3). Para os tempos de coleta, os horários 20 e 24 foram diferentes de U24. Esses valores médios obtidos foram superestimados devido a inclusão desses tempos de coleta nos cálculos e estimada excreção mínima na dose de APA de 5,4 mg/kg, que numericamente foi menor à observada com U24 (Tabela 2).

A excreção diária de creatinina estimada por extrapolação utilizando o valor médio de 16,10 mg/kg PC, observada a partir do volume urinário estimado¹ a cada 4 horas não foi diferente ($P > 0,05$) entre as dietas, tempo de coleta e interação entre dieta x tempo (Tabela 3). Portanto, como a excreção diária de creatinina foi subestimada quando comparadas a U24 (Tabela 4), pode-se confirmar que os volumes diários de urina obtidos por extrapolação, independente da duração de coleta, não são adequados para obtenção das excreções de DP estimados¹ (Tabela 4).

Como a excreção diária de creatinina não foi influenciada pelas dietas e constatou-se que não houve alterações na depuração de creatinina (Tabela 2), foi utilizada a média (22,8 mg/kg PC) para obter o volume urinário estimado² utilizando amostras urinárias em intervalos de 4 horas após alimentação da manhã (coleta *spot*) e urina total acumulativa referente ao volume estimado² e conseqüentemente a excreção de derivados de purina nessas amostras especificadas acima que estão apresentados nas Tabelas 3 e 4.

O índice DPC para coleta *spot* foi diferente entre dietas ($P < 0,05$), porém não foi detectado efeito de tempo e interação ($P > 0,05$) (Tabela 3), indicando a possibilidade de utilização de qualquer horário para amostragem de urina para determinação de concentração de DP e de creatinina. No entanto, os valores de índice DPC foram superestimados, devido aos menores valores de concentração de creatinina na amostra *spot* quando comparados com aqueles na urina total (U24) (Tabela 5). Essas menores concentrações de creatinina na urina *spot* foram responsáveis por superestimar os volumes de urina e, conseqüentemente, as excreções de DP (Tabela 3).

A excreção de DP utilizando método de urina total cumulativa de 4 horas estimada com volume urinário observado (24h¹), diferiu entre dietas, tempo de coleta, mas não houve interação significativa entre dieta x tempo. O tempo de coleta foi diferente apenas para 4 horas (Tabela 4), maior excreção de DP no intervalo de 4 h após alimentação da manhã pode ser reflexo de maior concentração sanguínea, consistente

com o período de pico de concentração pós-prandial de metabólitos (Cetinkaya et al., 2006; Nsahlai et al., 2000; Santos et al., 2018).

Pode-se observar que o volume urinário não diferiu ($P > 0,05$) entre as dietas, tempo de coleta *spot* e interação dieta x tempo ($P > 0,05$) (Tabela 3). Por outro lado, houve efeito do tempo de duração de coleta de urina total, sendo que as amostras coletadas durante 8 e 24 h diferiram do volume de urina mensurado (U24) (Tabela 4). Evidenciou-se, que o volume de urina obtido utilizando ambas amostragens foi superestimado comparando-se com o volume observado. Isso demonstra que os tempos de 8 e 24 h foram inadequados para amostragem de urina por interferirem de forma significativa na acurácia e exatidão dos resultados.

Para as excreções estimadas de DP utilizando amostras pontuais de urina *spot*, coletadas a intervalos de 4 h após alimentação da manhã, observou-se precisão na detecção de diferenças entre dietas (Tabela 3). Quando se utilizou amostras de urina total com duração 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h após alimentação matinal (Tabela 4), as excreções de DP foram superestimadas e não houve precisão para detecção de efeito de dieta ($P = 0,894$) e considerando os tempos de duração de coletas houve diferenças de excreção de DP e que também foram superestimadas quando comparadas com a amostra de urina total 24 h (U24).

Pode-se inferir que para a utilização de amostra de urina acumulativa de 4 horas de coleta não se deve utilizar o valor médio para excreção diária de creatinina (22,80 mg/kg PC) como indicador do volume urinário para obtenção da excreção diária de DP (Tabela 4). Por outro lado, a amostragem de urina *spot* foi adequada para obtenção da excreção de DP, independentemente do tempo de coleta e foi precisa na detecção de diferença entre as dietas (Tabela 3). Assim, os tempos mais adequados seriam de amostragens de urina pontuais entre 4 e 8 h, cujas estimativas de excreção de DP foram numericamente mais próximas à amostragem de urina total 24 h (U24).

Houve correspondência entre as concentrações de DP nas coletas de urina *spot* e acumulativa de 4 horas em relação às excreções diárias de DP, em que as dietas afetaram da mesma forma. Esses resultados demonstraram consistência com Fujihara et al. (2005) que encontraram uma correlação positiva entre concentração e excreção de DP ($r = 0,59$, $P < 0,05$) entre 7 e 8 h após a alimentação matinal para a amostragem de urina *spot* em ovinos alimentados duas vezes ao dia. Portanto, o ponto de tempo 24 h após alimentação da manhã para amostragem de urina *spot* foi o único que diferiu da

urina total 24 h e os tempos de 4 e 8 h foram os que mais se aproximaram, representando o ciclo circadiano (Tabela 5).

Não se constatou diferenças entre dietas para índice DPC obtido em amostras de urina total acumulativa de 4 horas e interação entre dieta x tempo ($P > 0,05$), porém houve efeito de tempo de coleta após alimentação matinal ($P < 0,05$) (Tabela 4). Esses resultados indicaram que amostras de urina acumulativa a cada intervalo de 4 h após alimentação da manhã não são adequadas para obtenção representativa da concentração de creatinina da U24. Porém, a concentração de DP nessas amostras sofreu alteração das dietas e os tempos de duração de coleta de 4 e 12 h diferiram da urina total 24 h (U24) (Tabela 5). Esses resultados demonstraram que a coleta de urina total durante 8 h após alimentação matinal poderá ser aplicada somente para determinação da concentração de DP e a utilização da creatinina nessa amostra como indicador de excreção urinária não é adequada por reduzir a acurácia e exatidão.

Tabela 5. Concentrações de derivados de purina e creatinina utilizando amostras de urina *spot* e total coletados em intervalos de 4 horas, após a alimentação matinal (T) e coleta de urina total de 24 h (U24) em cordeiros alimentados com dietas (D) contendo monensina (MON) e níveis de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

ITEM	MON	Níveis de APA (mg/kg MS)				EPM	D	Tempo de coleta (h)						EPM	T	D x T	
	2,1	0	2,3	4,6	9,2			4	8	12	16	20	24				U24
Derivados de purina (mmol/L)																	
<i>Spot</i>	17,62	17,67	12,84	13,72	18,13	0,74	0,005 ^A	12,76	12,78	16,60	16,24	18,95	21,01*	13,64	0,74	0,0004 ^a	0,648
Urina Total	17,46	17,39	17,80	14,56	19,63	0,67	0,029 ^B	22,21*	16,28	18,39*	16,37	16,98	17,71	13,64	0,67	0,0008 ^b	0,978
Creatinina (mmol/L)																	
<i>Spot</i>	4,06	4,48	4,47	4,33	4,39	0,22	0,963	4,86*	3,72*	3,50*	3,71*	3,79*	3,37*	7,46	0,22	<.0001 ^c	0,938
Urina total	5,05	5,08	4,41	4,05	5,20	0,26	0,429	5,34	4,29*	4,56*	4,45*	3,71*	3,48*	7,46	0,26	0,0001 ^d	0,755

$$^A Y = 0,2286X^2 - 1,9963X + 17,275 \quad (R^2 = 0,91)$$

$$^B Y = 0,1383X^2 - 1,1182X + 18,004 \quad (R^2 = 0,65)$$

$$^A Y = 0,0064X^2 + 0,2443X + 11,41 \quad (R^2 = 0,94)$$

$$^B Y = 0,0305X^2 - 1,0133X + 24,782 \quad (R^2 = 0,65)$$

$$^C Y = 0,0054X^2 - 0,2002X + 5,328 \quad (R^2 = 0,70)$$

$$^D Y = -0,0007X^3 + 0,0292X^2 - 0,4337X + 6,55 \quad (R^2 = 0,87)$$

CONCLUSÕES

A excreção de creatinina não é afetada nas doses de APA utilizadas, indicando o uso de único valor para estimar o volume urinário em amostras de urina *spot* coletadas 4, 8 e 12 h após a alimentação da manhã. Creatinina determinada em amostras de urina total coletadas a cada 4 h após alimentação da manhã não é adequada para estimar o volume urinário e a obtenção do índice DPC. O índice DPC apesar de ser superestimado, apresenta relação com a excreção de DP em amostras de urina *spot* e independe do tempo de coleta.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, A.M.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; VÉRAS, R.M.L; LEÃO, M.I.; DETMAN, E; PAULINO, M.F.; MARCONDES, M.I.; SOUZA, M.A. Efeito do período de coleta de urina, dos níveis de concentrado e de fontes protéicas sobre a excreção de creatinina, de uréia e de derivados de purina e a produção microbiana em bovinos Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.870-877, 2006.
- BEZERRA, L.R.; NETO, S.G.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, E.M.; SILVA, A.M.A. Estimativa da produção de proteína microbiana pelos derivados de purina. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.6, p.7-14, 2010.
- CETINKAYA, N.; YAMAN, S.; BABER, N.H.O. The use of purine derivatives/creatinine ratio in *spot* urine samples as an index of microbial protein supply in Yerli Kara crossbred cattle. **Livestock Science**. v.100, p.91-98, 2006.
- 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 technical details. **International Feed Resources Rowett Research Institute**, Bucksburn, ABR, United Kingdom, 21, 1992.
- CHEN, X.B.; JAYASURIYA, M.C.N.; MAKKAR, H.P.S. Measurement and application of purine derivatives: creatinine ratio in *spot* urine samples of ruminants. In: **Estimation of microbial protein supply in ruminants using urinary purine derivatives**. Springer, Dordrecht, 2004. p. 167-179.
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C; VALADARES, R.F.D.; CHIZZOTTI, F.H.M.; TEDESCHI, L.O. Determination of creatinine excretion and evaluation of *spot* urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Science**, v.113, p.218–225, 2008.
- DAVID, D.B; POLI, C.H.E.C; SAVIAN, G.A; AMARAL, G.A; AZEVEDO, E.B; JOCHIMS F. Uso da creatinina urinária como marcador nutricional e de volume urinário em ovinos alimentados com forragem tropical ou temperada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p.1009-1015, 2015.
- FUJIHARA, T.; SHEM, M.N.; NAKAMURA, K. Effect of dietary energy levels on the urinary excretion of purine derivatives in sheep. **Animal Science Journal**, v.76, p.441-445, 2005.
- GEORGE, S.K., DIPU, M.T., MEHRA, U.R., VERMA, A.K., SINGH, P. Influence of level of feed intake on concentration of purine derivatives in urinary *spot* samples and microbial nitrogen supply in crossbred bulls. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**. v.9, p.1291-1297, 2006.
- JÚNIOR, J.M.S; RENNÓ, L.N; VALADARES FILHO, S.C; PAULINO, M.F; DETMANN, E.; MENEZES, G.C.C.; MARTINS, T.S; PAULA, R.M; RODRIGUES, J.P.P; MARCONDES, M.L. Evaluation of collection days and times to estimate urinary

excretion of purine derivatives and nitrogen compounds in grazing Nellore cattle. **Livestock Science**, v.217, p.85-91, 2018.

KAMILI, A.; BENGOUMI, M.; OUKESSOU, M.; FAYE, B.; LEFEBVRE, H. P. Assessment of glomerular filtration rate in normally hydrated and dehydrated dromedary camel by plasma exogenous creatinine clearance test. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.25, p.314-320, 2013.

KOZLOSKI, G.V.; FIORENTINI, G.; HÄRTER, C.J.; SANCHEZ, L.M.B. Uso da creatinina como indicador da excreção urinária em ovinos. **Ciência Rural**, v.35, p.98-102, 2005.

KOZLOSKI, G.V., STEFANELLO, C.M., OLIVEIRA, L., FILHO, H.R., KLOPFENSTEIN, T.J. Evaluation of urinary purine derivatives in comparison with duodenal purines for estimating rumen microbial protein supply in sheep. **Journal of Animal Science**, v.95, p.884-891, 2017.

LEAL, T.L.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C.; CAMPOS, J.M.S.; DETMANN, E.; BARBOSA, A.M.; TEXEIRA, R.M.A.; MARCONDES, M.I. Variações diárias nas excreções de creatinina e derivados de purinas em novilhas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.905-911, 2007.

NAQVI, S.M.K.; KUMAR, D.; DE, K.; SEJIAN, V. Climate change and water availability for livestock: impact on both quality and quantity. In: **Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation**. Springer, New Delhi, 2015. p.81-95.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. **National Academies Press**. 2007.

NSAHLAI, I.V.; OSUJI, P.O.; UMUNNA, N.N. Effect of form and of quality of feed on the concentrations of purine derivatives in urinary *spot* samples, daily microbial N supply and predictability of intake. **Animal Feed Science and Technology**, v.85, p.223-238, 2000.

PEREIRA, M.L.A.; PEREIRA, T.C.J.; SILVA, H.G.O.; CRUZ, J.F.; ALMEIDA, P.J.P.; SANTOS, A.B.; SANTOS, E.J, PEIXOTO, C.A.M. Substitution of corn by mesquite pod meal in pellet diets for lambs: nitrogen compounds metabolism. In: **Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2013a. p.93-94.

PEREIRA, T.C.J. **Fontes energéticas e métodos de coleta de urina em ensaios de nutrição com cordeiros**. 2015. 114f. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Bahia, Brasil. 2015.

SAS (2006). *User's guide*: Statistics, version 9.1 edition. Cary, NC, USA: **Statistical Analysis Systems Institute**.

SANTOS, E.T; PEREIRA, M.L.A; SILVA, C.F.P.G, SOUZA-NETA, L.C; GERIS, R.; MARTINS, D.; SANTANA, A.E.G; BARBOSA, 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 Sciences**, v.14, p.8496-8516, 2013.

SANTOS, A.C.S.; SANTOS, S.A.; CARVALHO, G.G.P.; MARIZ, L.D.S.; TOSTO, M.S.L.; VALADARES FILHO, S. C.; AZEVEDO, J.A.G. A comparative study on the excretion of urinary metabolites in goats and sheep to evaluate *spot* sampling applied to protein nutrition trials. **Journal of Animal Science**, v.96, p.3381-3397, 2018.

SAEED, O.A.; SAZILI, A.Q.; AKIT, H.; ALIMON, A.R.; SAMSUDIN, A.A.B. Effect of corn supplementation on purine derivatives and rumen fermentation in sheep fed PKC and urea-treated rice straw. **Tropical Animal Health and Production**, v.50, p.1859-1864, 2018.