



**EFEITOS DO EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA
E DA MONENSINA EM DIETAS CONTENDO OU NÃO
CAROÇO DE ALGODÃO, SOBRE A COMPOSIÇÃO
MICROBIANA, PARÂMETROS RUMINAIS E PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS**

LEANDRO SANTOS E SILVA

2024



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

**EFEITOS DO EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA
E DA MONENSINA EM DIETAS CONTENDO OU NÃO
CAROÇO DE ALGODÃO, SOBRE A COMPOSIÇÃO
MICROBIANA, PARÂMETROS RUMINAIS E PERFIL DE
ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS**

Autor: Leandro Santos e Silva
Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Outubro de 2024

LEANDRO SANTOS E SILVA

**EFEITOS DO EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA E DA
MONENSINA EM DIETAS CONTENDO OU NÃO CAROÇO DE
ALGODÃO, SOBRE A COMPOSIÇÃO MICROBIANA,
PARÂMETROS RUMINAIS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO
LEITE DE VACAS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lúcia Albuquerque Pereira
Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Ferreira da Silva

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Outubro de 2024

636.085 Silva, Leandro Santos e.
S581e Efeitos do extrato alcaloídico de algaroba e da monensina em dietas contendo ou não caroço de algodão, sobre a composição microbiana, parâmetros ruminais e perfil de ácidos graxos do leite de vacas. / Leandro Santos e Silva. – Itapetinga-BA: UESB, 2024. 151p.

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

1. Algaroba – Alcalóides piperídnicos – Dietas – Vacas leiteiras. 2. Vacas lactantes – Dietas – Extrato de algaroba. 3. Vacas leiteiras – Dietas – Algaroba – Caroço de algodão. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Zootecnia, *Campus* de Itapetinga. II. Pereira, Mara Lúcia Albuquerque. III. Silva, Fabiano Ferreira da. IV. Título.

CDD (21): 636.085

Catálogo na Fonte:

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

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Leite – Ácidos graxos

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: “Efeitos do extrato alcaloídico de algaroba e da monensina em dietas contendo ou não caroço de algodão, sobre a composição microbiana, parâmetros ruminais e perfil de ácidos graxos do leite de vacas”

Autor: Leandro Santos e Silva

Orientadora: Prof^ª. Dra. Mara Lúcia Albuquerque Pereira

Coorientador: Prof. Dr. Fabiano Ferreira da Silva

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

Documento assinado digitalmente
gov.br MARA LUCIA ALBUQUERQUE PEREIRA
Data: 01/11/2024 10:19:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^ª. Dra. Mara Lúcia Albuquerque Pereira - UESB (Orientadora)

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANO FERREIRA DA SILVA
Data: 25/11/2024 12:43:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabiano Ferreira da Silva – UESB (Coorientador)

Documento assinado digitalmente
gov.br OMER CAVALCANTI DE ALMEIDA
Data: 04/11/2024 09:25:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Omer Cavalcanti de Almeida – UFAPE

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCAS MIRANDA MARQUES
Data: 11/11/2024 09:12:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques – UFBA

Documento assinado digitalmente
gov.br ANA PAULA GOMES DA SILVA
Data: 22/11/2024 11:11:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Ana Paula Gomes da Silva – UESB

Data de realização: 30 de outubro de 2024.

Campus de Itapetinga

(77) 3261-8628 | ppz@uesb.edu.br

Campus de Itapetinga
Praça da Primavera, 40
Bairro Primavera
CEP 45.700-000
PABX.: (77) 3261 - 8600

Campus de Jequié
Rua José Moreira Sobrinho, s/n
Bairro Jequeizinho
CEP 45.200 - 000
PABX.: (73) 3528 - 9600

Campus de Vitória da Conquista
Estrada do Bem Querer, km 4
Bairro Universitário
CEP: 45031 - 300
PABX.: (77) 3424 - 8600

O otimismo é a fé
daquele que conduz à
realização; nada pode
ser feito sem esperança.

Helen Keller

À minha mãe Genilda,
ao meu pai Clodoaldo,

que sob muito sol,

fizeram-me chegar até aqui,

na
sombra.

Dedico...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por até aqui ter me sustentado e me dado forças para seguir.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por ter me possibilitado desenvolver este estudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa;

Aos amores da minha vida, Genilda e Clodoaldo, meus pais, e ao meu irmão Evandro, por toda o apoio e por sempre me amarem, me apoiarem e me incentivarem a seguir o meu sonho, mesmo diante de tantas provações;

Aos meus avós, tios e primos por sempre torcerem por mim e por todas orações que fizeram ao meu nome. Amo vocês;

À minha orientadora, Professora Dra. Mara Lúcia de Albuquerque Pereira, pela orientação, incentivos, ensinamentos, compreensão, paciência e sobretudo pela amizade. Sem dúvidas, a senhora é um exemplo de profissional e pessoa a ser seguido;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fabiano Ferreira da Silva, pela coorientação, incentivo e grande ajuda no planejamento e condução do experimento. A sua contribuição foi fundamental;

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Zootecnia da UESB pelas horas dedicadas e conhecimentos compartilhados;

Às secretárias do PPZ, Raquel e Roberta, que sempre estiveram à disposição para sanar dúvidas e ajudar no que fosse necessário;

À Universidade Federal da Bahia pela parceria nas análises de qPCR. Em especial ao Professor Dr. Lucas Miranda Marques e ao Pós-doutorando Dr. Manoel Neres Santos Júnior pela ajuda e ensinamentos;

Às vacas Espanha, Laranja, Charroa, Cani e Cabana, que de forma involuntária, contribuíram tão significativamente para a realização desse experimento e com a Ciência brasileira;

À fazenda Valeu o Boi, em especial ao Gabriel, Dalva, Ryan, Samuel e aos demais funcionários, pela ajuda e companheirismo durante a realização do experimento e pela amizade;

Aos motoristas da UESB, que sempre estavam à disposição para auxiliar nas necessidades do experimento;

Ao Laboratório de Fisiologia Animal da UESB, em especial ao técnico Zé, que ajudou na realização das análises bromatológicas;

Ao Laboratório de Métodos de Separações Químicas (LABMESQ) da UESB, em especial ao técnico Aroldo Brandão e a Pós-Doc Dra. Ana Paula, que tanto contribuíram para a realização das análises de ácidos graxos;

Aos amigos que fiz na UESB: Flávia, Hugo, Virginia, Leinha, George, Cleiton, Hélio, Luan, Elen, Jéssica, Jaine, Denise, Luna e todos que se fizeram presentes durante esses anos de doutorado;

Aos meus amigos da vida: Emanuel, Cristiane, Vanessa e Thais, que mesmo de longe, sempre me deram forças e me incentivaram a nunca desistir.

Aos que estiveram ao meu lado em Itapetinga: Rafael, Tia Lua, Bia, Anne, Cátia, Dani Alexandrino e Rafa. Levarei vocês sempre em meu coração.

A TODOS, MUITO OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Leandro Santos e Silva, filho de Genilda Gomes Santos Silva e José Clodoaldo e Silva, nasceu em Arapiraca, Alagoas, no dia 29 de dezembro de 1989.

Em fevereiro de 2012 iniciou o curso de Zootecnia, na Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, foi bolsista de Iniciação Científica (IC) de 2013 a 2017, sob orientação da Profa. Dra. Greicy Mitzi Bezerra Moreno, e concluiu em fevereiro de 2017 obtendo o título de “Zootecnista”.

Ainda em fevereiro de 2017, iniciou o curso de Mestrado strictu sensu no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco, unidade acadêmica de Garanhuns-PE, sob orientação do Prof. Dr. Omer Cavalcanti Almeida. Foi bolsista da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), e em março de 2019 defendeu a Dissertação para obter o título de “Mestre em Ciência Animal e Pastagens”.

No mesmo mês, iniciou o curso de Doutorado strictu sensu no programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), sob orientação da Profa. Dra. Mara Lúcia Albuquerque Pereira. Foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e em 30 de outubro de 2024 defendeu a referida Tese para obter o título de “Doutor em Zootecnia”.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XIII
RESUMO	XVII
ABSTRACT.....	XIX
I - REFERENCIAL TEÓRICO	1
1.1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2. Aditivos alimentares para bovinos leiteiros	2
1.2.1. Monensina	2
1.2.2. Alcaloides piperidínicos de algaroba como fitoaditivo alimentar para ruminantes	6
1.3. Caroço de algodão na alimentação de vacas lactantes.....	10
1.4. Efeito dos aditivos sobre a microbiota ruminal	12
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	15
II - OBJETIVOS.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
III – CAPÍTULO 1 - O EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA E A MONENSINA, EM DIETAS COM OU SEM CAROÇO DE ALGODÃO, ALTERAM OS PARÂMETROS RUMINAIS E A POPULAÇÃO MICROBIANA DO RÚMEN DE VACAS LACTANTES	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT.....	27
1 – INTRODUÇÃO	28
2 - MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Protocolo experimental	30
2.2. Matéria-prima vegetal e obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA).....	30

2.3. Local, animais e delineamento experimental.....	32
2.4. Composição das dietas experimentais e manejo alimentar.....	32
2.5. Coleta de dados e análises	34
2.6. Análises estatísticas.....	41
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1. Metabólitos sanguíneos.....	43
3.2. Características fermentativas no rúmen.....	45
3.3. População microbiana do rúmen.....	50
4 – CONCLUSÕES	75
5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
IV – CAPÍTULO 2 - EFEITO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA OU MONENSINA, EM DIETAS CONTENDO OU NÃO CAROÇO DE ALGODÃO SOBRE A POPULAÇÃO BACTERIANA DO RÚMEN E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS	90
RESUMO.....	90
ABSTRACT.....	91
1 – INTRODUÇÃO	92
2 – MATERIAL E MÉTODOS.....	94
2.1. Protocolo experimental	94
2.2. Obtenção da matéria-prima vegetal	94
2.3. Obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba	94
2.4. Local, animais e delineamento experimental.....	96
2.5. Composição das dietas experimentais e manejo alimentar.....	96
2.6. Coleta de Dados e análises.....	98
2.7. Análise estatística.....	106
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4 – CONCLUSÕES	126
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Valores médios da abundância relativa de bactérias totais (1A) e <i>Archaea</i> total (1B) em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON. As populações são expressas como porcentagens do número de cópias do gene 16S rRNA do total de Ct. Dentro de cada painel, diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	58
Figura 2. Valores médios de abundância relativa de espécies bacterianas ruminais Gram-positivas em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON. As populações são expressas como porcentagens do número de cópias do gene 16S rRNA do domínio bacteriano total. Dentro de cada painel, diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	59
Figura 3. Valores médios de abundância relativa de espécies bacterianas ruminais Gram-negativas em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON. As populações são expressas como porcentagens do número de cópias do gene 16S rRNA do domínio bacteriano total. Dentro de cada painel, diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).....	60

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Página
Tabela 1. Alcalóides piperidínicos identificados a partir do ECB de vagens de <i>Prosopis juliflora</i>	31
Tabela 2. Composição das dietas experimentais	33
Tabela 3. Quantidade e qualidade do DNA extraído.....	37
Tabela 4. Sequências de primers utilizados no ensaio de qPCR.....	39
Tabela 5. Metabólitos do soro sanguíneo de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON	43
Tabela 6. Potencial hidrogeniônico (pH), concentrações de N-amoniaco (N-NH ₃), Lipopolissacarídeos (LPS), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e estimativa da produção de dióxido de carbono (CO ₂) e metano (CH ₄) em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	46
Tabela 7. Ordem, família e gênero de protozoários ciliados ruminais encontrados em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	51
Tabela 8. Concentrações ($\times 10^3$ /mL de líquido ruminal) e composição relativa de protozoários ciliados no líquido ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	52
Tabela 9. Coeficientes de correlação de Spearman entre os gêneros de protozoários ciliados ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON	54

Tabela 10. Principais efeitos dos aditivos (APA ou MON), associados ou não com o caroço de algodão, sobre a abundância relativa de bactérias ruminais e <i>Archaea</i> em vacas lactantes	61
Tabela 11. Coeficientes de correlação de Spearman entre espécies de bactérias ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	63
Tabela 12. Coeficientes de correlação de Spearman entre os gêneros de protozoários ciliados e bactérias ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	63
Tabela 13. Unidades por mL (U/mL) de enzimas ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	73

Capítulo 2	Página
Tabela 1. Alcalóides piperidínicos identificados a partir do ECB de vagens de <i>Prosopis juliflora</i>	95
Tabela 2. Composição e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais.....	97
Tabela 3. Quantidade e qualidade do DNA extraído.....	99
Tabela 4. Sequências de primers utilizados no ensaio de qPCR.....	101
Tabela 5. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente de ácidos graxos (AG) em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON.....	107
Tabela 6. Abundância Relativa (AbR) de genes de 16S rRNA de Filos de bactérias do rúmen de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON	109

- Tabela 7** Composição dos ácidos graxos saturados (AGS) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON..... 110
- Tabela 8.** Composição dos ácidos graxos mono (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON111
- Tabela 9.** Composição dos ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON 113
- Tabela 10.** Composição dos ácidos graxos linoleicos conjugados (CLA) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON..... 117
- Tabela 11.** Coeficientes de correlação de Spearman entre as espécies de bactérias ruminais e ácidos graxos do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON..... 119
- Tabela 12.** Valores médios relativos aos somatórios de ácidos graxos do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON 123
- Tabela 13.** Atividade da enzima Δ^9 -dessaturase nos ácidos graxos do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON..... 125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AbR	Abundância relativa
AcOH	Ácido acético
AG	Ácido graxo
AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCIR	Ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada
AGI	Ácidos graxos insaturados
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGS	Ácidos graxos saturados
APA	Alcalóides Piperidínicos de Algaroba
ART	Açúcares redutores totais
AST	Aspartato aminotransferase
BEM	Balanco energético negativo
BHB	β -hidroxibutirato
CA	Caroço de algodão
CaBPs	Proteínas de ligação ao Ca^{2+}
CH_2O	Formaldeído
CH_3OH	Metanol
CH_4	Metano
CHCl_3	Clorofórmio
CLA	Ácido linoleico conjugado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLC	Capsula de liberação controlada
CMCase	Carboximetilcelulase
CO_2	Dióxido de carbono
CT	Colesterol total
Ct	Cycle threshold (limite de ciclo)

$C_{30}H_{30}O_8$	Gossipol
C4:0	Ácido butírico (butirato)
C6:0	Ácido capróico
C8:0	Ácido caprílico
C10:0	Ácido cáprico
C11:0	Ácido hendecanóico
C12:0	Ácido láurico
C13:0	Ácido tridecanóico
C14:0	Ácido mirístico
C14:1	Ácido miristoleico
C15:0	Ácido pentadecílico
C15:0 <i>iso</i>	Ácido iso pentadecílico
C15:0 <i>anteiso</i>	Ácido anteiso pentadecílico
C15:1 <i>cis</i> -9	Ácido pentadecenóico
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C17:0	Ácido margárico
C17:0 <i>iso</i>	Ácido iso margárico
C17:0 <i>anteiso</i>	Ácido anteiso margárico
C17:1 <i>cis</i> -9	Ácido heptadecenóico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1 <i>cis</i> -9	Ácido oleico
C18:1 <i>trans</i> -9	Ácido elaídico
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	Ácido linoleico
C18:2n6	Ácido γ linoleico
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	Ácido linolênico
C18:3n3	Ácido α linolênico
C18:3n6	Ácido γ linolênico
C20:0	Ácido araquídico
C20:3n6	Ácido di-homo α linolênico
C20:3n3	Ácido eicosatrienoico
C21:0	Ácido heneicosanóico
C22:0	Ácido behênico
C22:1n9	Ácido erúcico

C23:0	Ácido tricosanoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DQL	Delineamento quadrado latino
ECB	Extrato clorofórmico básico
EE	Extrato etéreo
EEB	Extrato etanólico bruto
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN _{cp}	Fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína
FDN _i	Fibra em detergente neutro indigestível
GGT	γ -glutamyltransferase
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HH	Relação entre ácidos graxos hipocolesterêmicos e hipercolesterêmicos
HPO ₃	Ácido metafosfórico
IA	Índice de aterogenicidade
IT	Índice de trombogenicidade
KOH	Hidróxido de potássio
LAL	Lisado de amebócito Limulus
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeos
MON	Monensina Sódica
MN	Matéria natural
MS	Matéria seca
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
N-NH ₃	Nitrogênio XVmmoniacal
NRC	National Research Council
pH	Potencial Hidrogeniônico
PT	Proteína total

rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SAA-I	Solução aquosa ácida I
SAA-II	Solução aquosa ácida II
SAB-I	Solução aquosa básica I
SAB-II	Solução aquosa básica II
SAB-III	Solução aquosa básica III
TG	Triglicerídeos
TNT	Tecido-não-tecido
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

RESUMO

E SILVA, Leandro Santos. **Efeitos do extrato alcaloídico de algaroba e da monensina em dietas contendo ou não caroço de algodão, sobre a composição microbiana, parâmetros ruminais e perfil de ácidos graxos do leite de vacas.** Itapetinga, BA: UESB, 2024, 135p. Tese. (Doutorado em Zootecnia, Área de Concentração em Produção de Ruminantes).*

Objetivou-se com este estudo, avaliar os efeitos da suplementação com extrato de alcaloídes piperidínicos de algaroba (APA) ou Monensina sódica (MON) em dietas contendo ou não caroço de algodão (CA) para vacas lactantes, sobre os metabólitos sanguíneos, produtos de fermentação, população microbiana (protozoários e bactérias), atividade enzimática ruminal, consumo e digestibilidade de ácidos graxos e seu perfil no leite. As dietas experimentais consistiram em: uma dieta controle sem aditivo e sem CA; duas dietas sem CA, contendo APA (8 mg/kg MS) ou MON (15 mg/kg MS); e duas dietas com CA contendo APA (8 mg/kg MS) ou MON (15 mg/kg MS). Foram utilizadas 5 vacas mestiças Holandês x Gir, pluríparas, com produção média diária de $29,5 \pm 7,15$ kg de leite, com peso corporal médio de $487 \pm 7,25$ kg e média de 100 ± 20 dias de lactação. Foram distribuídas em delineamento quadrado latino 5 x 5, em um período experimental de 130 dias, divididos em 5 períodos de 26 dias, com 21 dias de adaptação e 5 para coleta de amostras. APA e MON nas dietas sem CA reduziram ($P < 0,05$) o colesterol total sérico. Foi observada alteração nos parâmetros ruminais, com aumento ($P < 0,0001$) nas concentrações de N-NH₃ e de acetato nas dietas APA e MON. A população microbiana foi afetada pelas dietas, em que APA e MON reduziram a porcentagem de abundância relativa (%AbR) de *Ruminococcus albus* ($P < 0,0001$), *Streptococcus bovis* ($P < 0,0001$), *Fibrobacter succinogenes* ($P = 0,0002$) e *Archaea* metanogênicas ($P < 0,0001$), e aumentaram *Prevotella ruminicola* ($P < 0,0001$), *Selenomonas ruminantium* ($P < 0,0001$) e *Megaphaera elsdenii* ($P < 0,0001$). APA reduziu ainda a %AbR de *Butyrivibrio fibrisolvens* ($P = 0,0001$) e aumentou a de *Ruminobacter amylophilus* ($P < 0,0001$). As dietas contendo CA e/ou suplementadas com APA aumentaram o consumo de EE ($P = 0,0005$). Não houve alteração ($P > 0,05$) no consumo de MS e o CA aumentou o consumo de AG com 16 ($P = 0,0005$) e 18 ($P = 0,0031$) carbonos e aumentou a digestibilidade de AG com 16 carbonos ($P = 0,0351$). APA aumentou a concentração de C6:0 ($P = 0,0029$) e C8:0 ($P = 0,0007$) no leite. O CA, aumentou a concentração de AGCL ($P < 0,0001$), AGI ($P < 0,0001$), AGMI ($P < 0,0001$), *trans* total ($P = 0,0162$), \sum *cis*-9 ($P < 0,0001$) e reduziu a atividade da enzima Δ^9 -dessaturase em AG com 18 carbonos ($P < 0,0001$), sem influência dos aditivos. APA assemelha-se a MON quanto à alteração do microbioma core do rúmen. APA sem CA aumenta a concentração de AGCC totais (acetato, propionato e butirato) sem alterar a proporção de metano no fluido ruminal mesmo com redução de *Archaea*, por aumentar a população de *R. amylophilus*, que se correlaciona de forma positiva com metanogênicos por simbiose. APA e MON aumentam as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta à média no leite. *R. amylophilus* apresenta moderada correlação negativa com a biohidrogenação do ácido linoleico tanto pela via *trans*-11 quanto *trans*-10. APA

*Orientadora: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, DSc. UESB and Coorientador: Fabiano Ferreira da Silva, DSc. UESB.

e MON, associados ou não ao CA, apresentam efeitos semelhantes sobre os metabólitos sanguíneos, parâmetros ruminais, população microbiana do rúmen e perfil de ácidos graxos do leite de vacas, sendo APA a melhor opção como aditivo alimentar por ser natural e seguro.

Palavras-chave: aditivos alimentares, bactérias ruminais, fitoaditivo, *Prosopis juliflora*

ABSTRACT

E SILVA, Leandro Santos. **Effects of mesquite alkaloid extract and monensin in diets containing or not cottonseed on the microbial composition, ruminal parameters and fatty acid profile of cow's milk.** Itapetinga, BA: UESB, 2024, 135p. Thesis (PhD in Animal Science – Ruminant Production).*

The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation with mesquite piperidine alkaloid (MPA) extract or sodium monensin (MON) in diets containing or not cottonseed (CS) for lactating cows, on blood metabolites, fermentation products, microbial population (protozoa and bacteria), ruminal enzyme activity, intake and digestibility of fatty acids and their profile in milk. The experimental diets consisted of: a control diet without additive and without CS; two diets without CS, containing MPA (8 mg/kg DM) or MON (15 mg/kg DM); and two diets with CS containing MPA (8 mg/kg DM) or MON (15 mg/kg DM). Five multiparous Holstein x Gir crossbred cows with an average daily milk production of 29.5 ± 7.15 kg, average body weight of 487 ± 7.25 kg and average lactation of 100 ± 20 days were used. They were distributed in a 5 x 5 Latin square design, in an experimental period of 130 days, divided into 5 periods of 26 days, with 21 days of adaptation and 5 for sample collection. MPA and MON in diets without CS reduced ($P < 0.05$) serum total cholesterol. Changes in ruminal parameters were observed, with an increase ($P < 0.0001$) in N-NH₃ and acetate concentrations in the MPA and MON diets. The microbial population was affected by the diets, in which MPA and MON reduced the percentage relative abundance (%Rab) of *Ruminococcus albus* ($P < 0.0001$), *Streptococcus bovis* ($P < 0.0001$), *Fibrobacter succinogenes* ($P = 0.0002$) and methanogenic *Archaea* ($P < 0.0001$), and increased *Prevotella ruminicola* ($P < 0.0001$), *Selenomonas ruminantium* ($P < 0.0001$) and *Megaphaera elsdenii* ($P < 0.0001$). MPA also reduced the %Rab of *Butyrivibrio fibrisolvens* ($P = 0.0001$) and increased that of *Ruminobacter amylophilus* ($P < 0.0001$). Diets containing CS and/or supplemented with MPA increased EE intake ($P = 0.0005$). There was no change ($P > 0.05$) in DM intake and CS increased the intake of FA with 16 ($P = 0.0005$) and 18 ($P = 0.0031$) carbons and increased the digestibility of FA with 16 carbons ($P = 0.0351$). MPA increased the concentration of C6:0 ($P = 0.0029$) and C8:0 ($P = 0.0007$) in milk. CS increased the concentration of LCFA ($P < 0.0001$), UFA ($P < 0.0001$), MUFA ($P < 0.0001$), total *trans* ($P = 0.0162$), \sum *cis*-9 ($P < 0.0001$) and reduced the activity of the enzyme Δ^9 -desaturase in FA with 18 carbons ($P < 0.0001$), without influence of additives. MPA is similar to MON regarding alteration of the rumen core microbiome. MPA without CS increases the concentration of total SCFA (acetate, propionate and butyrate) without altering the proportion of methane in the ruminal fluid even with a reduction in *Archaea*, by increasing the population of *R. amylophilus*, which is positively correlated with methanogens by syntrophy. MPA and MON increase the concentrations of short to medium chain fatty acids in milk. *R. amylophilus* has a moderate negative correlation with the biohydrogenation of linoleic acid by both the *trans*-11 and *trans*-10 pathways. MPA and MON, associated or not with CA, have similar effects on blood metabolites, ruminal parameters, rumen microbial population

*Adviser: Mara Lúcia Albuquerque Pereira, DSc. UESB and Co-adviser: Fabiano Ferreira da Silva, DSc. UESB.

and fatty acid profile of cow's milk, with MPA being the best option as a feed additive as it is natural and safe.

Keywords: feed additives, phytoadditive, *Prosopis juliflora*, ruminal bacteria

I - REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

A nutrição animal é um dos pilares da pecuária eficiente e impacta diretamente nos custos de produção, uma vez que é responsável por cerca de 70% dos gastos totais em uma propriedade (Cottle e Kahn, 2014). É responsável por manter as reações fisiológicas normais do animal, como crescimento, liberação de hormônios, gestação, deposição de gordura, produção de leite ou carne, manutenção do sistema imunológico, dentre outros.

Devido ao alto custo destinado à alimentação animal, a utilização de fontes lipídicas, bem como de aditivos alimentares como estratégia nutricional para melhorar a eficiência alimentar em ruminantes têm sido bastante difundidas. Dentre as fontes de lipídios utilizadas, o caroço de algodão (CA) tem sido recomendado, principalmente na alimentação de vacas leiteiras de alta produção, uma vez que possui a capacidade de alterar positivamente a fermentação ruminal e o perfil de ácidos graxos do leite, bem como é potencial inibidor de bactérias produtoras de H₂ e protozoários, e pode ser tóxico para Archaea metanogênica (Martin et al., 2010; Muñoz et al., 2019), o que auxilia na redução da produção de metano entérico. A possibilidade de resposta satisfatória às dietas contendo CA e suplementadas com aditivos alimentares tem despertado estudos em ruminantes.

Dentre os aditivos mais utilizados estão os ionóforos carboxílicos, como a lasolacida, monensina, salinomicina, narasina e maduramicina, que são antibióticos de baixo peso molecular utilizados como estimuladores de crescimento (e Silva et al., 2021), além de afetarem a microbiota ruminal seletivamente pela alteração da passagem de íons através dos canais de membrana de bactérias Gram-positivas (Pressman, 1976). Inicialmente, os ionóforos foram utilizados em rações para aves como anticoccidianos, porém, são os aditivos mais pesquisados em dietas de ruminantes atualmente (Pereira e Silva, 2021). Dentre eles, a monensina é o ionóforo mais utilizado.

Apesar dos benefícios do uso de ionóforos na alimentação de ruminantes, algumas desvantagens limitam sua utilização, como a possibilidade de intoxicação por

apresentarem uma pequena margem de segurança entre a dose eficaz e a tóxica; podem causar contaminação ambiental por não serem absorvidos pelo trato gastrointestinal e contraria as premissas de segurança alimentar do mercado consumidor, que tem exigido produtos com rigoroso controle sanitário (Pereira e Silva, 2021).

A possibilidade de indução de resistência bacteriana, liberação de contaminantes no ambiente e o risco de resíduos de antibióticos em produtos de origem animal levaram alguns países a banir o uso de antibióticos ionóforos como aditivos alimentares na pecuária de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1831/2003 e com o princípio da precaução, principalmente, antibióticos que são compartilhados ao uso terapêutico humano.

Desde então, pesquisadores têm buscado desenvolver aditivos alimentares naturais a base de metabólitos secundários de plantas, que possam ser extraídos sem alterações de sua estrutura química e que apresentem atividade biológica no rúmen.

As plantas apresentam em sua estrutura, compostos secundários, que recebem essa classificação por não apresentarem relação direta com processos metabólicos de fotossíntese, respiração e crescimento da planta (Edwards e Wratten, 1981), porém, são utilizados como mecanismo de defesa contra fitófagos e fitopatógenos e auxiliam na propagação da espécie. Estes compostos secundários de plantas são classificados de acordo com sua rota biossintética, podendo ser taninos, terpenos e esteroides, e os alcaloides (Harbone, 1999).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da monensina e do extrato enriquecido com alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) em dietas contendo ou não caroço de algodão (CA) sobre a diversidade microbiana ruminal (protozoários, bactérias e *Archaea* total), parâmetros ruminais, consumo e digestibilidade de ácidos graxos e perfil de ácidos graxos do leite de vacas.

1.2. Aditivos alimentares para bovinos leiteiros

1.2.1. Monensina

A monensina é um poliéter carboxílico, produzido pela bactéria *Streptomyces canelaensis* (não é *cinnamomensis*), melhorador de desempenho animal que se classifica como antimicrobiano ionóforo, por sua ação bacteriostática seletiva, e atua principalmente sobre as bactérias Gram-positivas e protozoários, alterando o transporte transmembrana e o equilíbrio intracelular de íons (Russell e Strobel, 1989). Este processo se dá pela ligação da monensina às membranas celulares bacterianas,

forçando-as a gastar energia na tentativa de manter o equilíbrio iônico celular (Russell e Strobel, 1989). O excessivo gasto de energia resulta em morte ou diminuição no crescimento de bactérias.

Apesar da maior sensibilidade de bactérias Gram-positivas devido a presença de paredes celulares mais tênues, estudos têm demonstrado que a sensibilidade e resistência à monensina ainda não são tão claras (Kim, et al., 2014a; Guo et al., 2022). De acordo com resultados encontrados por Newbold et al. (1993), alguns táxons de bactérias Gram-positivas, como a Veillonellaceae, foram resistentes à monensina. Do mesmo modo, Kim et al. (2014b) identificaram sensibilidade à monensina em alguns táxons de bactérias Gram-negativas, como o *Succiniclaticum*.

A literatura mostra que, a resistência à monensina está principalmente correlacionada com as especificidades na estrutura do envelope celular, em que se aplica um modelo de efeito variável dependendo da constituição e espessura da parede celular, em que a monensina seleciona grupos bacterianos com paredes celulares menos permeáveis (Russell e Houlihan, 2003; Weimer et al., 2008; Schären et al., 2017).

Em contrapartida, bactérias Gram-positivas que são sensíveis à monensina, como *Streptococcus* spp., que convertem amido em ácido láctico, o que causa a diminuição do pH ruminal, têm suas populações reduzidas (Piantoni et al., 2023). Essa redução permite com que as bactérias que convertem o amido em propionato pela via do acrilato se proliferem, causando o aumento de propionato em relação ao acetato, o que acredita ser a razão pela qual a monensina aumenta a eficiência alimentar em ruminantes, uma vez que o propionato é um precursor gliconeogênico e é convertido em energia mais eficientemente do que o acetato (Dennis et al., 1981; Bergman, 1990; Russell e Strobel, 1989; Dubuc et al., 2010). Desta forma, a suplementação com monensina resulta ainda em menor síntese de formato e butirato em comparação ao propionato, além da diminuição da degradabilidade ruminal da proteína (Hook, et al., 2009; Abrar et al., 2015).

Por aumentar a síntese de propionato e, conseqüentemente a gliconeogênese hepática, a monensina é utilizada também na prevenção da cetose por aumentar o fornecimento de energia para o animal (Ipharraguerre e Clark, 2003). A cetose pode ser causada em vacas leiteiras em lactação devido o balanço energético negativo (BEN) no início ou próximo ao pico de lactação, acarretando em mobilização excessiva dos tecidos e aumento da capacidade de metabolização do fígado (Duffield, 2000; Bobe et al., 2004).

A cetose pode ser classificada em clínica ou subclínica, sendo a clínica, dividida em quatro estágios: primário, quando a vaca não recebe alimentação necessária em quantidades adequadas; secundário, quando uma vaca leiteira recebe calorias insuficientes para satisfazer as exigências da lactação mais a manutenção do corpo; alimentar, quando a dieta é rica em precursores cetogênicos e; espontânea, que acomete vacas leiteiras de alta produção que estão perto do pico de lactação. Este período é considerado o de maior exigência energética ou de BEN, o que elevaria os valores de β -hidroxiacetato (Müller et al., 2015; Barboza e Primieri, 2021).

De acordo com Mammi et al. (2021), a monensina em cápsula de liberação controlada (CLC) é a forma mais adequada de se combater a cetose em vacas leiteiras, visto que apresenta efeitos mais eficientes quando comparado com outras formas, doses ou durações de administração. Essa forma de administração da monensina em vacas leiteiras é a única permitida na Europa (European Medicine Agency, 2013) e deve ser feita de 3 a 4 semanas antes do parto, para exercer efeitos eficazes na prevenção da cetose (Elanco Animal Health).

Os efeitos da CLC são destacados por Compton et al. (2015), que identificaram redução da incidência cumulativa absoluta de cetose subclínica em 17,9% em vacas leiteiras, no período de 12 dias após o parto, o que reforça ser a melhor forma de fornecimento.

Se tratando de resultados de desempenho e produção de bovinos leiteiros em relação à monensina, vários estudos têm demonstrado melhorias devido à suplementação, como redução no consumo de matéria seca (Sauer et al., 1989; Ghizzi et al., 2018), melhora na conversão alimentar (Vyas et al., 2018) e aumento na produção de leite (Duffield et al., 2008; Grigoletto et al., 2021), além de prevenir distúrbios metabólicos (McCarthy et al., 2015; McGuffey, 2017) e possibilitar a redução na emissão de gases poluentes (Odongo et al., 2007; Xue et al., 2021). As variáveis de produção em resposta à monensina são dependentes de fatores como grupo genético, escore corporal dos animais e tipo de rebanho (Lean et al., 1994; Duffield et al., 1999; Granzin e Druden, 1999; Duffield et al., 2008).

Dentre as variáveis de produção, a porcentagem de gordura do leite é a que apresenta mais resultados inconsistentes quanto ao impacto da monensina. De acordo com Duffield et al. (1999), a suplementação com monensina não influencia o teor de gordura do leite em vacas leiteiras. Em contrapartida, AlZahal et al. (2008) e Robinson (2020) relataram que a utilização de monensina na dieta de vacas leiteiras em lactação

reduz o percentual de gordura do leite e aumenta a concentração de ácidos graxos poliinsaturados e de ácido linoleico conjugado (CLA). O efeito depressor de gordura causado pela monensina se deve à interação com fatores dietéticos, dose utilizada de monensina, método de administração, estágio de lactação e sistema de alimentação (Symanowski et al., 1999; Duffield e Bagg, 2000; Duffield et al., 2003).

Os efeitos da suplementação com monensina como mitigador de gases de efeito estufa em ruminantes ainda são controversos devido à ausência de informações sobre o mecanismo de ação em microrganismos produtores de metano (CH₄). De acordo com Vyas et al. (2018), a monensina não reduziu a intensidade de CH₄ em bovinos de corte recebendo 33 mg/kg de MS. Em contrapartida, Perna Junior et al. (2020) identificaram redução de 25,6% na emissão de CH₄, em vacas holandesas recebendo 18 mg/kg de MS.

De forma geral, bactérias Gram-positivas e protozoários têm como produto da fermentação ruminal, dentre outros, a produção de hidrogênio (H₂), que por sua vez, é utilizado pelos metanogênicos do rúmen para reduzir gás carbônico (CO₂) em CH₄ (McGuffey et al., 2001; Ugobogu et al., 2019). Assim, considera-se que o impacto da monensina na produção de CH₄ se dá através da supressão de outros microrganismos ruminais que fornecem substratos aos metanogênicos.

Em estudo realizado por Hook et al. (2009), que avaliaram o efeito da monensina sobre a quantidade e diversidade de metanogênicos ruminais de bovinos leiteiros em lactação, não identificaram alterações significativas nos animais que receberam monensina, dos que receberam dieta controle (sem monensina), o que reforça a hipótese de que a ação da monensina como mitigador de CH₄, se dá pela redução de substratos viáveis à utilização dos metanogênicos.

De acordo com Sauer et al. (1998), a adição de monensina à dieta de vacas em lactação reduz a produção de CH₄ e a relação CO₂:CH₄. Entretanto, quando o fornecimento de monensina excede os 160 dias, a proporção CO₂:CH₄ não é mais influenciada e outros efeitos relacionados são ausentes. Os autores explicam que, possivelmente, a microflora ruminal se adapta à monensina e já não responde como antes, criando resistência. Em contrapartida, Odongo et al. (2007) identificaram redução de 7% na produção de CH₄ em vacas leiteiras recebendo monensina por aproximadamente 180 dias. Alguns fatores como consumo de ração, tipo de carboidrato ofertado na dieta, processamento e composição da dieta podem influenciar a ação da monensina e, conseqüentemente, a taxa de produção de CH₄ (Johnson e Johnson, 1995).

1.2.2. Alcaloides piperidínicos de algaroba como fitoaditivo alimentar para ruminantes

A algarobeira (*Prosopis* spp.) é uma árvore da família das leguminosas (Leguminosae, subfamília Mimosoideae) e apresenta mais de 40 espécies conhecidas, distribuídas nos continentes americano, asiático e africano. Caracteriza-se por possuir caule tortuoso, podendo atingir 18 m de altura e diâmetro variando entre 30 e 80 cm, casca rugosa, presença de espinhos, folhas bipinadas, folíolos numerosos, subcoriáceas, estômatos em ambas as faces das folhas, inflorescência auxiliares, pedunculadas em espigas, primavera a estival (Braga 1976; Franco et al., 2010). As maiores concentrações dessas espécies são encontradas nas regiões ocidentais mais secas da América como o sudeste dos Estados Unidos e a Patagônia (Ribaski et al., 2009).

No Brasil, a espécie *Prosopis juliflora* (Sw.) D.C. foi introduzida no semiárido nordestino em 1942, na cidade de Serra Talhada, PE, com sementes oriundas de Piura, no Peru, para cultivo de madeira, forragem e como alternativa de reflorestamento em áreas desmatadas do bioma Caatinga, sendo difundida para o resto do país (Ribaski et al., 2009).

A ampla disseminação da algarobeira pelo Nordeste brasileiro foi de grande importância para o fortalecimento da agropecuária na região e despertou interesse de técnicos e produtores, por suportar as condições semiáridas e por apresentar alto potencial forrageiro durante as secas, período com restrição de alimento para os animais (Franco et al., 2010), onde seus frutos são utilizados na alimentação de animais ruminantes, equinos e muares, além do uso na alimentação humana (Rodrigues et al., 2013). Proporcionou ainda a exploração econômica da apicultura (Sousa et al., 2011) e o fornecimento de alimento para a população (Jardim e Mendes, 2022).

Na alimentação humana, a farinha das vagens da algarobeira é utilizada para enriquecer produtos de panificação (Jardim e Mendes, 2022), uma vez que as vagens, tanto *in natura* quanto em forma de farinha, possuem um alto valor nutricional e constituem uma fonte rica em carboidratos, proteínas e fibras dietéticas (Silva et al., 1996; Silva et al., 2001; Nascimento et al., 2015), sendo uma alternativa às farinhas convencionais como a de trigo e de mandioca (Costa et al., 2016), que são pobres nestes constituintes.

Já na alimentação animal, o uso da algaroba tem crescido de forma expressiva e se apresenta como alternativa alimentar na dieta de ruminantes. No geral, a planta possui alta palatabilidade e valor nutritivo, com médias variando entre 90,2 e 92,3% de

matéria seca (MS), 21,6 e 33% de proteína bruta (PB), 27,1 e 29,1% de fibra em detergente neutro (FDN), 18,2 e 27,6% de fibra em detergente ácido (FDA) e 7,8 e 8,7% de minerais (Baht et al., 2011; Ali, et al., 2012; Chaturvedi e Sahoo, 2013). Segundo Andrade-Montemayor et al., (2009) e Ruiz-Nieto et al. (2020) a variação no valor nutritivo está relacionada a diversos fatores como o estágio fenológico, parte da planta (folhas ou frutos), região geográfica de cultivo e condições climáticas, além da forma de tratamento dos frutos, que quando torrados, pode aumentar a disponibilidade de nutrientes.

Outra característica importante da utilização de algaroba na alimentação de ruminantes é a possibilidade de redução nos custos da dieta. De acordo com Tesema et al. (2013) o fornecimento de 50% de vagens *in natura* na alimentação concentrada de ovinos, numa relação volumoso:concentrado de 50:50, resulta em maior lucro líquido com melhor custo-benefício. O fornecimento da farinha de vagem de algaroba pode substituir o milho em até 40,5% na alimentação de cabras lactantes, sem interferir no consumo, digestibilidade e concentração de nutrientes digestíveis totais (Pereira et al., 2013). No entanto, a quantidade de vagem seca de algaroba presente na dieta de ruminantes não deve exceder 40% da matéria seca total, a fim de evitar intoxicações por fatores antinutricionais presentes na planta, como toxinas e polifenólicos (Ortega-Nieblas et al., 1996; Sawal et al., 2004, Svensson et al., 2004).

Estudos (Tabosa et al., 2006; Câmara et al., 2009) mostram que a intoxicação pelo consumo de vagens de *P. juliflora* em ruminantes causa distúrbios neurológicos, com comprometimento dos nervos cranianos, especialmente os nervos trigêmeos e facial, o que resulta em sinais clínicos como inclinação da cabeça, protrusão da língua e salivação excessiva, e acomete principalmente os bovinos. Já caprinos e ovinos têm se mostrado resistentes ao envenenamento por *P. juliflora* (Tabosa et al., 2000; Almeida et al., 2017), com sinais clínicos aparentes em dietas compostas por vagens acima de 60%.

De acordo com Almeida et al. (2017), a intoxicação por algaroba em ruminantes, provavelmente, seria causada pela combinação de alcaloides piperidínicos presentes na planta, em especial a juliprosopina, que interfere na bioenergética das mitocôndrias do cérebro, causando redução na produção de ATP e morte celular (Maioli et al., 2012).

As piperidinas são fitoquímicos pertencentes ao grupo dos alcaloides heterocíclicos, que possuem uma lipofilicidade e polaridade acentuadas, contribuindo para a sua incorporação nas membranas celulares, e podem afetar o funcionamento de vários canais iônicos, em particular a atividade bloqueadora dos canais de Ca^{2+}

(Efimova et al., 2020, Choudhary et al., 2005). A ação de bloqueio do transporte de cálcio pode afetar tanto as bactérias Gram-positivas (Efimova et al., 2020) como as Archaea metanogênicas (Vancek et al., 2006).

No entanto, pesquisas tem demonstrado a eficiência do extrato enriquecido com alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) na alimentação de ruminantes (Brito et al., 2020; Santos et al., 2021; Sousa et al., 2022), por possibilitar alterações na fermentação ruminal semelhantes aos ionóforos. De acordo com Santos et al. (2013), os APA apresentaram efeito inibitório, em sua maioria, contra bactérias Gram-positivas e reduziu a produção de gases através da modificação dos produtos finais da fermentação dos alimentos, com maior produção de propionato em condições *in vitro* com líquido ruminal.

Os alcaloides são substâncias alcalinas (caráter básico), oriundos do metabolismo secundário de alguns vegetais. São compostos nitrogenados derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina) e alifáticos (ornitina, lisina) e têm sido bastante utilizados na indústria farmacêutica (Cozier et al., 2006).

Os possíveis efeitos do APA foram descritos por Batatinha (1997), que identificou o aumento na síntese de aminoácidos, proteínas e nos ácidos propiônico e n-valérico, em testes *in vitro*, utilizando rúmen artificial (RUSITEC – rumen simulation technique). O mesmo autor identificou ainda redução na produção de CH₄, ácido acético e iso-valérico.

Da mesma forma, Pereira et al. (2017) avaliaram os efeitos do APA em comparação com a monensina, quanto à cinética de produção de gases, mitigação de CH₄ e os produtos da fermentação ruminal, utilizando a técnica de produção de gás *in vitro*. Os autores relataram maior eficiência na degradação da fibra e redução na produção de gases totais, CH₄ e na relação acetato/propionato, nos tratamentos que utilizaram APA.

Estudos *in vivo* demonstraram a efetividade do APA como suplemento alternativo à monensina na dieta de ruminantes. Brito et al. (2020) identificaram que a suplementação com APA (31,5 mg/kg de MS da dieta) em cordeiros confinados, alimentados com dietas contendo 13% de PB, aumenta o aproveitamento ruminal da proteína dietética e conseqüentemente, a eficiência microbiana no rúmen, sem alterar o comportamento ingestivo e o ganho de peso corporal, quando comparado com dietas contendo 16% de PB sem aditivos ou suplementadas com MON (31,5 mg/kg de MS da dieta).

Da mesma forma, Santos et al. (2021) relataram que a suplementação com APA em dietas para cordeiros, melhora o desempenho de crescimento. Os autores testaram níveis de APA (0; 2,3; 4,6 e 9,2 mg/kg de MS da dieta) em comparação com a MON (2,1 mg/kg de MS da dieta) e identificaram aumento linear no ganho de peso médio diário (169,4; 189,1; 193,7; 201,4 g/dia, respectivamente) e no ganho de peso total (14,6; 16,3; 16,7; 17,3 kg, respectivamente), superiores ao tratamento com MON (174,9 g/dia e 15 kg, para as mesmas variáveis).

O APA tem sido avaliado também quanto a sua potencialidade como mitigador de CH₄. De acordo com Sousa et al. (2022), a suplementação com doses variando de 6,6 a 27,8 mg/kg de MS da dieta, reduz a produção e a intensidade de CH₄ entérico e melhora a utilização de energia e proteína em cordeiros confinados. Os autores citaram ainda que a suplementação com doses de APA variando de 17,3 a 27,6 mg/kg de MS da dieta, aumenta a digestibilidade da fibra, bem como a proporção de energia bruta digestível e metabolizável.

Em bovinos leiteiros, Costa (2022) relatou menor intensidade diária na produção de CH₄ por ingestão de nutrientes, nos animais que receberam 5 mg APA/kg MS da dieta. O autor explicou que este resultado pode ser devido à ação do APA sobre Archaea metanogênicas, visto que, a síntese de metano pode ser afetada por efeito seletivo através da inibição direta e/ou depressão dos processos metabólicos microbianos envolvidos na metanogênese (Bodas et al., 2012). O autor relatou também, resultados positivos para a produção e para o conteúdo de ácidos graxos do leite, com aumento dos ácidos palmitoleico (C16:1) e heptadecanóico (C17:0), com a utilização de 5 mg APA/kg MS da dieta.

Vale ressaltar que a síntese de C16:1 na glândula mamária é resultado da atividade da enzima Δ^9 -dessaturase ou da biohidrogenação incompleta desse ácido graxo no rúmen. Já a síntese de C17:0, de acordo com Vlaeminck et al. (2006), é proveniente da síntese *de novo*, incorporados na membrana celular das bactérias ruminais. Desta forma, Costa (2022) levantou a possibilidade de o APA atuar na maior disponibilização intestinal de ácidos graxos como substratos da enzima Δ^9 -dessaturase ou favorecer a incompleta biohidrogenação ruminal, além de atuar sobre o metabolismo microbiano ruminal.

1.3. Carço de algodão na alimentação de vacas lactantes

O carço de algodão (CA) é um subproduto da indústria têxtil, que tem sido utilizado como alimento na nutrição de ruminantes, principalmente na dieta de vacas leiteiras de alto rendimento, há mais de três décadas no mundo (Zhang et al., 2007). Dentre as variedades mais comercializadas está o algodão Upland (*Gossypium hirsutum*; com mais fiapos) e o algodão Pima (*G. barbedense*) (Zhang et al., 2007). É considerado um alimento altamente palatável e completo, por reunir características de alimento volumoso (fibra bruta superior a 18% na MS), de concentrado proteico (proteína bruta superior a 20% na MS) e de concentrado energético (Arieli, 1998).

Para bovinos leiteiros, o CA tem sido bastante utilizado, por aumentar a produção e alterar a composição do leite e os processos digestivos das vacas. De acordo com Rico et al., (2017), dietas basais contendo CA aumentam o rendimento de ácidos graxos do leite, com destaque para os oriundos da biohidrogenação ruminal, além de aumentar a digestibilidade de ácidos graxos de 16 carbonos. Os autores observaram ainda, aumentos na produção de leite e proteína do leite, na digestibilidade de ácidos graxos totais e tendência para produção de gordura do leite, em dietas contendo CA.

Da mesma forma, Muñoz et al., (2019) relataram aumento no teor de lactose e tendência de aumento na proteína do leite em dietas contendo CA, além de aumentar a concentração de ácidos graxos mono e poli-insaturados na gordura do leite. Os autores relataram ainda a redução na produção de CH₄ (g/d) e sua intensidade (g/kg de CMS).

A utilização de fontes lipídicas, como o CA, na dieta de ruminantes tem sido utilizada como estratégia eficaz na mitigação de CH₄ em ruminantes (Martin et al., 2010; Hristov et al., 2013) através de vários mecanismos. Os lipídios podem inibir microrganismos ruminais, como bactérias produtoras de H₂ e também protozoários, além de serem tóxicos para os metanogênicos (Martin et al., 2010). Os lipídios dietéticos diminuem também substrato fermentescível no rúmen, uma vez que os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) não são fermentados nas condições ruminais (Knapp et al., 2014).

No entanto, a principal limitação na utilização do CA na dieta de ruminantes é a presença do gossipol (C₃₀H₃₀O₈), uma toxina natural, presente no algodoeiro (*Gossypium* L.), que tem como função deter as pragas de insetos. É um composto aldeído polifenólico amarelo, encontrado em maiores concentrações nas glândulas pigmentares do CA, considerado um fator antinutricional (Zhang, et al., 2007).

O gossipol pode ser encontrado na forma livre ou associada (às proteínas). A forma associada não é considerada tóxica para ruminantes (Zhang et al., 2007). No entanto, a maior parte do gossipol encontrado no CA está em sua forma livre (Noftsger et al., 2000; Mena et al., 2001).

Em sua forma livre, o gossipol é tóxico para animais não ruminantes, em que atua reduzindo a capacidade de oxigenação do sangue, o que causa insuficiência respiratória e endema pulmonar (Alford et al., 1996). Os efeitos da toxicidade do gossipol é semelhante em animais não ruminantes, pré-ruminantes e ruminantes machos, não sendo característicos em fêmeas (Randel et al., 1996; Chenoweth et al., 2000).

De acordo com Mena et al. (2001), os efeitos adversos que o gossipol pode causar em fêmeas ruminantes é o aumento da fragilidade eritrocitária ou diminuição da fertilidade. No entanto, os efeitos foram atribuídos ao fornecimento de farinha de algodão ou de CA inteiro da variedade Pima, que apresenta mais gossipol livre. Segundo o relatório da Autoridade Europeia para a Segurança alimentar (EFSA, 2017), não são identificados efeitos negativos em vacas de alta produção ou novilhas em crescimento, para níveis de até 1000 mg/kg de dieta, de gossipol livre (correspondendo a 37 mg/kg PC/dia), quando o CA é da variedade Upland.

Estudos têm demonstrado que a microbiota ruminal, principalmente fungos e bactérias, são capazes de degradar o gossipol. Khalaf e Meleigy (2008) relataram que *Candida tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger* são capazes de reduzir os níveis de gossipol livre no CA. No entanto, de acordo com Deruiter et al. (1992), a maioria das cepas fúngicas que degradam o gossipol, produzem como metabólitos algumas toxinas, que são prejudiciais aos ruminantes. Os autores utilizaram isolados de espécies de *Aspergillus* como fermentadores do gossipol e identificaram a produção de uma toxina típica de citrinina.

Em contrapartida, estudos recentes têm demonstrado que algumas espécies de bactérias ruminais, são capazes de degradar mais eficientemente o gossipol. Segundo Zhang et al. (2018), a espécie *Bacillus subtilis* apresenta alto poder de desintoxicação do gossipol (utiliza como fonte de carbono), reduz a concentração de gossipol livre (78,86%) presente no CA fermentado e aumenta o teor de PB e de aminoácidos essenciais. Os autores reforçaram que esta cepa foi aprovada como probiótico para consumo humano e animal pela Food and Drug Administration e a colonização de *B. subtilis* no intestino reduz o risco de infecção bacteriana patogênica.

Da mesma forma, Wang et al. (2021) relataram a capacidade das espécies de *Lactobacillus* (Gram-positivas) em biodegradar o gossipol e utilizá-lo como fonte de carbono. Foi observada redução de até 80% na concentração de gossipol livre e de 4% e 5% nos teores de FDN e FDA, respectivamente. Em contrapartida, o teor de PB aumentou 4% e o conteúdo de aminoácidos essenciais melhorou significativamente.

1.4. Efeito dos aditivos sobre a microbiota ruminal

Os aditivos alimentares para ruminantes, de forma geral, têm como característica principal a capacidade de alterar a fermentação ruminal e, conseqüentemente, melhorar a eficiência alimentar. Esta característica se dá pela resposta dos microrganismos ruminais, principalmente de bactérias e protozoários, ao aditivo.

Dentre os aditivos, os ionóforos têm sido os mais estudados quanto à resposta microbiana ruminal, com destaque para a monensina sódica. De acordo com McGarvey et al. (2019) a suplementação com monensina em vacas leiteiras em lactação, nas dosagens variando entre 368 e 518 mg/vaca/dia, aumenta significativamente as bactérias do filo *Bacteroidetes* e diminui as do filo *Firmicutes*. Vale salientar que o filo *Bacteroidetes* consiste principalmente de bactérias Gram-negativas, ou seja, possuem uma membrana externa (Furuhashi et al., 2007). Ao contrário, o filo *Firmicutes*, que não apresenta membrana externa e consiste predominantemente em bactérias Gram-positivas (Pistelli e Costa, 2010).

Estudos de Narvaez et al. (2013) e Shen et al. (2017) demonstraram que a suplementação com monensina em ruminantes está diretamente ligada com a redução da digestibilidade dos alimentos. A literatura relata que o efeito adverso da monensina na digestão dos alimentos está relacionado com a inibição de bactérias celulolíticas, principalmente *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus*. De acordo com Shen et al. (2017), a redução na digestibilidade tem como consequência a redução na produção de CH₄, devido à diminuição da fermentação em culturas descontínuas (Ungerfeld, 2015).

Apesar dos estudos de Russell (1987) e Chow e Russell (1990) relatarem a eficiência em reduzir a população de bactérias Gram-positivas, a monensina se liga igualmente bem às duas colorações de Gram (Chow et al., 1994), assim como algumas bactérias Gram-positivas se adaptam à monensina (Weimer et al., 2011; Simjee et al., 2012).

Evidências têm demonstrado que a microbiota se adapta ao fornecimento de monensina a longo prazo. Guo et al. (2022) observaram maior adaptabilidade das bactérias degradadoras de carboidratos à monensina ao avaliarem as sucessões da comunidade bacteriana ruminal. Os autores relataram ainda que bactérias Gram-negativas, entre as notáveis bactérias sensíveis à monensina, foram muito maiores do que as Gram-positivas, evidenciando que os padrões dinâmicos temporais das bactérias ruminais durante a adaptação à monensina não seguem uma dicotomia clara entre as colorações de Gram.

Com a restrição progressiva na utilização da monensina como suplemento alimentar para ruminantes, estudos alternativos com fitoaditivos têm evidenciado eficiência sobre a manipulação da microbiota ruminal. Patra e Yu (2012) verificaram o efeito das doses (0,25, 0,50 e 1,0 g/L) de cinco óleos essenciais (OE; óleo de cravo, óleo de eucalipto, óleo de alho, óleo de orégano e óleo de hortelã-pimenta) sobre os parâmetros ruminais *in vitro* e observaram que todos os OE diminuíram a abundância de Archaea, protozoários e principais bactérias celulolíticas (*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e *R. albus*) linearmente com o aumento das doses. Foi identificado também redução significativa na produção de metano com a dose de 1%, para todos os OEs.

Da mesma forma, tem-se avaliado o efeito do APA sobre a atividade microbiana no rúmen. A atividade antimicrobiana e de produção de gases *in vitro* dos extratos enriquecidos de alcaloides de vagens de *Prosopis juliflora* (Fabaceae) foram avaliados com o objetivo de desenvolver um produto com função de aditivo em rações para ruminantes. Como apenas o extrato clorofórmico básico (ECB), cujos principais constituintes foram juliprosopina, (juliflorina), juliprosinina e prosopiflorina (majoritário), apresentou atividade antibacteriana para bactérias Gram-positivas: *Micrococcus luteus* [Concentração Inibitória Mínima (MIC) = 25 ug/mL], *Staphylococcus aureus* (MIC = 50ug/mL) e *Streptococcus mutans* (MIC = 50 ug/mL), sua influência sobre a digestão ruminal foi avaliada usando a técnica semi-automática de produção de gás *in vitro*, com a monensina utilizada como controle positivo (Santos et al., 2013). Os resultados mostraram que ECB 100 mg/L inibiu de forma mais eficaz a produção de gás com um mínimo de 6 mL/100 mg de matéria seca de substrato com 30 h de fermentação, enquanto monensina proporcionou uma produção não acumulada de 11,7 mL/100 mg de matéria seca. A produção acumulada de gás sofreu redução de 21% na presença de 100 mg/L de ECB em relação ao controle e à monensina utilizada na concentração recomendada pelo fabricante. A degradabilidade verdadeira da matéria seca foi menor

com a concentração de 200 mg/L de ECB no tempo de incubação de 36 h. Por fim, apenas monensina elevou a produção de massa microbiana em 18 h, que foi reduzida em 36 h de incubação (Santos et al., 2013).

A suplementação com APA na dieta de ruminantes também tem demonstrado potencial como mitigador de metano entérico. De acordo com Sousa et al. (2023), ovinos suplementados com APA reduziram a emissão de CH₄ e a perda de energia pelas fezes em 16% e 14%, respectivamente, além de ter aumentado o balanço energético em 34,75%. Desta forma, novos estudos que abordem o efeito do APA sobre a microbiota ruminal são importantes.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAR, A.; TSUKAHARA, T.; KONDO, M.; BAN-TOKUDA, T.; CHAO, W.; MATSUI, H. Effect of monensin withdrawal on rumen fermentation, methanogenesis and microbial populations in cattle. **Animal Science Journal**, v.86, p.849–854, 2015.

ALFORD, B.B.; LIEPA, G.U.; VANBEBER, A.D. Cottonseed protein, what does the future hold. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.49, p.1–11, 1996.

ALI, A.S.; TUDSRI, S.; RUNGMEKARAT, S.; KAEWTRAKULPONG, K. Effect of feeding *Prosopis juliflora* pods and leaves on performance and carcass characteristics of Afar sheep. **Kasetsart Journal-Natural Science**, v.46, p.871–881, 2012.

ALMEIDA, V.M.; ROCHA, B.P.; PFISTER, J.A.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F.; CHAVES, H.A.S.; SILVA FILHO, G.B.; MENDONÇA, F.S. Spontaneous poisoning by *Prosopis juliflora* (Leguminosae) in sheep. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, p.110-114, 2017

ALZAHAL, O.; ODONGO, N.E.; MUTSVANGWA, T.; OR-RASHID, M.M.; DUFFIELD, T. F.; BAGG, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B.W. Effects of Monensin and Dietary Soybean Oil on Milk Fat Percentage and Milk Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1166-1174, 2008.

ANDRADE-MONTEMAYOR, H.; ALEGRÍA-RÍOS, F.; PACHECO-LÓPEZ, M.; AGUILAR-BORJAS, H.; VILLEGAS-DÍAZ, J.L.O.; BASURTO-GUTIERREZ, R.; JIMENEZ-SEVERIANO, H.; VERA-ÁVILA, H.R. Effect of dry roasting on composition, digestibility and degradability of fiber fractions of mesquite pods (*Prosopis laevigata*) as feed supplement in goats. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.11, p.237–243, 2009.

ARIELI, A. Whole cottonseed in dairy cattle feeding: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.72, p.97-110, 1998.

BARBOZA, J.C.; PRIMIERI, C. Cetose em vacas leiteiras: incidência subclínica da doença. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v.4, p.233-239, 2021.

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

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, p.567-590, 1990.

BHATT, S.; CHOVIYIYA, S.G.; SHAH, A.R. Evaluation of raw and hydrothermally processed *Prosopis juliflora* seed meal as supplementary feed for the growth of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, v.17, p.164-173, 2011.

BOBE, G.; YOUNG, J.W.; BEITZ, D.C. Invited review: Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3105-3124, 2004.

BODAS, R.N.; PRIETO, N.R.; GARCÍA GONZÁLEZ, R.S.; ANDRÉS, S.; GIRÁLDEZ, F.J.; LÓPES, S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. **Animal Feed Science and technology**, v.176, p.78-93, 2012.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste: especialmente do Ceará**. 3ed. Fortaleza: Departamento Nacional de Obras Contra Secas, 1976.

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

CÂMARA, A.C.L.; COSTA, N.A.; RIET-CORREA, F.; AFONSO, J.A.B.; DANTAS, A.F.M.; MENDONÇA, C.L.; SOUZA, M.I. Spontaneous poisoning in cattle by mesquite beans *Prosopis juliflora* (Leg. Mimosoideae) in Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.233-240, 2009.

CHATURVEDI, O.H.; SAHOO, A. Nutrient utilization and rumen metabolism in sheep fed *Prosopis juliflora* pods and Cenchrus grass. **Springerplus**, v.2, p.1–7, 2013.

CHENOWETH, P.J.; CHASE JR., C.C.; RISCO, C.A.; LARSEN, R.E. Characterization of gossypol-induced sperm abnormalities in bulls. **Theriogenology**, v.53, p.1193–1203, 2000.

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

CHOW, J.M.; VAN KESSEL, J.A.; RUSSELL, J.B. Binding of radiolabels monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1630–1635, 1994.

CHOW, J.M.; RUSSELL, J. B. Effect of ionophores and pH on growth of *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture. **Applied and Environment Microbiology**, v.56, p.1588–1593, 1990.

COMPTON, C.W.R.; YOUNG, L.; MCDUGALL, S. Efficacy of controlled-release capsules containing monensin for the prevention of subclinical ketosis in pasture-fed dairy cows. **New Zealand Veterinary Journal**, v.63, p.249-253, 2015.

COSTA, D.S. **Níveis de extrato Alcaloídico de algaroba como aditivo alimentar em dieta de vacas lactantes**. 2022. 68p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, Itapetinga.

COSTA, J.D.; MACEDO, A.D.B.; SILVA, A.P.F.; CAMPOS, A.R.N. Elaboração de Farinha de Algaroba (*Prosopis juliflora*) em Forno de Micro-ondas. In: SEMANA DE QUÍMICA DA UFCG, 2., 2016, Cajazeiras, **Anais...** Cajazeiras: UFCG, 2016. p.1-6.

COTTLE, D.; KAHN, L. **Beef Cattle Production and Trade**. CSIRO Publishing: Clayton, Australia, 2014, p.221.

COZIER, A.; CLIFFORD, M.N.; ASHIHARA, H. **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet**. Blackwell Publishing: Oxford, 2006, p.372.

DENNIS, S.M.; NAGARAJA, T.G.; BARTLEY, E.E. Effects of lasolocid or monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. **Journal of Animal Science**, v.52, p.418-426, 1981.

DERUITER, J.; JACYNO, J.M.; DAVIS, R.A.; CUTLER, H.G. Studies on aldose reductase inhibitors from fungi. I. Citrinin and related benzopyran derivatives. **Journal of Enzyme Inhibition**, v.6, p.201-210, 1992.

DUBUC, J.; DUTREMBLAY, D.; BARIL, J.; BAGG, R.; BRODEUR, M.; DUFFIELD, T.; DESCÔTEAUX, L. A field study on the effects of dietary monensin on milk production and milk composition in dairy cows. **The Canadian Veterinary Journal**, v.51, p.375-379, 2010.

DUFFIELD, T. Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. The Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, v.16, p.231-253, 2000.

DUFFIELD, T.F.; BAGG, R.N. Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. **The Canadian Veterinary Journal**, v.41, p.388-394, 2000.

DUFFIELD T.; BAGG, R.; KELTON, D.; DICK, P.; WILSON J. A field study of dietary interactions with monensin on milk fat percentage in lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.4161-4166, 2003.

DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; SANDALS, D.; LISSEMORE, K.; MCBRIDE, B.W.; LUMSDEN, J.H.; DICK, P.; BAGG, R. Effect of prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on milk production and milk components in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.272-279, 1999.

DUFFIELD, T.F.; RABIEE, A.R.; LEAN, I.J. A Meta-Analysis of the Impact of Monensin in Lactating Dairy Cattle. Part 2. Production Effects. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1347-1360, 2008.

EDWARDS, P.J.; WRATTEN, S.D. **Ecologia das interações entre insetos e plantas**. São Paulo: EPU, 1981, 79p.

EFIMOVA, S.S.; ZAKHAROVA, A.A.; OSTROUMOVA, O.S. Alkaloids Modulate the Functioning of Ion Channels Produced by Antimicrobial Agents via an Influence on the Lipid Host. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.8, 537, 2020.

EFSA, European Food Safety Authority. Presence of free gossypol in whole cottonseed. **EFSA Journal**, v.15, e04850, 2017.

E SILVA, S.N.S.; CHABRILLAT, T.; KERROS, S.; GUILLAUME, S.; GANDRA, J.R.; CARVALHO, G.G.P.; SILVA, F.F.; MESQUITA, L.G.; GORDIANO, L.A.; CAMARGO, G.M.F.; RIBEIRO, C.V.M.; ARAUJO, M.L.G.M.L.; ALBA, H.D.R.; E SILVA, R.D.G.; FREITAS JUNIOR, J. E. Effects of plant extract supplementations or monensin on nutrient intake, digestibility, ruminal fermentation and metabolism in Dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.275, 114886, 2021.

EUROPEAN MEDICINE AGENCY. **European Public Assessment Reports (EPAR)**. (2013). Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/kexxtone>>. Acesso em: 29 ago. 2023.

FRANCO, E.S.; NETO, J.D.; FARIAS, M.S.S.; LIRA, V.M.; ARAÚJO, M.G.S. Viabilidade Sócio-ambiental da Algaroba no Cariri Paraibano. **Engenharia Ambiental**, v.7, n.4, p. 232-248, 2010.

FURUHASHI, M.; TUNCMAN, G.; GÖRGÜN, C.Z.; MAKOWSKI, L.; ATSUMI, G.; VAILLANCOURT, E.; KONO, K.; BABAEV, V.R.; FAZIO, S.; LINTON, M.F.; SULSKY, R.; ROBL, J.A.; PARKER, R.A.; HOTAMISLIGIL, G.S. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. **Nature**, v.447, p.959-965, 2007.

GHIZZI, L.G.; DEL VALLE, T.A.; TAKIYA, C.S.; SILVA, G.G.; ZILIO, E.M.C.; GRIGOLETTO, N.T.S.; MARTELLO, L.S.; RENNÓ, F.P. Effects of functional oils on ruminal fermentation, rectal temperature, and performance of dairy cows under high temperature humidity index environment. **Animal Feed Science and Technology**, v.246, p.158-166, 2018.

GRAZIN, B.; DRYDEN, G.M.L. The effects of monensin on milk production and levels of metabolites in blood and rumen fluid of Holstein-Friesian cows in early lactation. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.39, p.933-940, 1999.

GRIGOLETTO, N.T.S.; GHIZZI, L.G.; GHELLER, L.S.; DIAS, M.S.S.; NUNES, A.T.; SILVA, T.B.P.; SILVA, G.G.; SILVA, L.F.C.; LOBATO, D.N.; RENNÓ, F.P. Effects of a blend of live yeast and organic minerals or monensin on performance of dairy cows during the hot season. **Journal of Dairy Science**, v.104, p.11634-11645, 2021.

GUO, X.; LIU, Y.; JIANG, Y.; YAO, J.; LI, Z. Ruminal Bacterial Community Successions in Response to Monensin Supplementation in Goats. **Animals**, v.12, 2291, 2022.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products, In: WALTON, N.J.; BROWN, D.E. (Eds.). **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London: Imperial College, p.1-25, 1999.

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

HRISTOV, A.N.; OH, J.; FIRKINS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKKAR, H.P.; ADESOGAN, A.T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P.J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J.M. Special topics–mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v.91, p.5045–5069, 2013.

IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.106, p.39-57, 2003.

JARDIM, L.A.S.; MENDES, M.L.M. Caracterização físico-química de farinha de algaroba e sua utilização na panificação. **Research, Society and Development**, v.11, e70111133246, 2022.

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

KHALAF, M.A.; MELEIGY, S.A. Reduction of free gossypol levels in cottonseed meal by microbial treatment. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.10, p.185-190, 2008.

KIM, M.; FELIX, T.L.; LOERCH, S.C.; YU, Z. Effect of haylage and monensin supplementation on ruminal bacterial communities of feedlot cattle. **Current Microbiology**, v.69, p.169-175, 2014a.

KIM, M.; EASTRIDGE, M.L.; YU, Z. Investigation of ruminal bacterial diversity in dairy cattle fed supplementary monensin alone and in combination with fat, using pyrosequencing analysis. **Canadian Journal of Microbiology**, v.60, p.65–71, 2014b.

KNAPP, J.R.; LAUR, G.L.; VADAS, P.A.; WEISS, W.P.; TRICARICO, J.M. Invited review: enteric methane in dairy cattle production: quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.3231–3261, 2014.

LEAN, I.J.; CURTIS, M.; DYSON, R.; LOWE, B. Effects of sodium monensin on reproductive performance of dairy cattle. I. Effects on conception rates, calving-to-conception intervals, calving-to-heat and milk production in dairy cows. **Australian Veterinary Journal**, v.71, p.273-277, 1994.

MAIOLI, M.A.; LEMOS, D.E.C.V.; GUELFY, M.; MEDEIROS, H.C.D.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MINGATTO, F.E. Mechanism for the uncoupling of oxidative phosphorylation by juliprosopine on rat brain mitochondria. **Toxicon**, v.60, p.1355-1362, 2012.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v.4, p.351–365, 2010.

MCCARTHY, M.M.; YASUI, T.; RYAN, C.M.; PELTON, S.H.; MECHOR, G.D.; OVERTON, T.R. Metabolism of early-lactation dairy cows as affected by dietary starch and monensin supplementation. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.3351-3365, 2015.

MCGARVEY, J.A.; PLACE, S.; PALUMBO, J.; HNASKO, R.; MITLOEHNER, F. Dosage-dependent effects of monensin on the rumen microbiota of lactating dairy cattle. **MicrobiologyOpen**, v.8, e00783, 2019.

MCGUFFEY, R.A. 100-year review: Metabolic modifiers in dairy cattle nutrition. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.10113-10142, 2017.

MCGUFFEY, R.; RICHARDSON, L.; WILKINSON, J. Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v.84, E194-E203, 2001.

MENA, H.; SANTOS, J.E.P.; HUBER, J.T.; SIMAS, J.M.; TARAZON, M.; CALHOUN, M.C. The effects of feeding varying amounts of gossypol from whole cottonseed and cottonseed meal in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2231-2239, 2001.

MÜLLER, L.G.H.; FRANÇA, G.A.; HARTMANN, W. Diagnóstico de cetose subclínica de vacas no periparto. **Revista eletrônica de biociências, biotecnologia e saúde**, n. 12, mai-ago. 2015.

MUÑOZ, C.; SÁNCHEZ, R.; PERALTA, A.M.T.; ESPÍNDOLA, S.; YAN, T.; MORALES, R.; UNGERFELD, E.M. Effects of feeding unprocessed oilseeds on methane emission, nitrogen utilization efficiency and milk fatty acid profile of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v.249, p.18-30, 2019.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.2517-2522, 2013.

NASCIMENTO, S.P.A.; LIMA, S.K.A.; CAVALCANTI, F.C.; GUSMÃO, P.R. Cinética de secagem de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora* SW). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.10, p.115-119, 2015.

NEWBOLD, C.; WALLACE, R.; WALKER, N. The effect of tetronasin and monensin on fermentation, microbial numbers and the development of ionophore-resistant bacteria in the rumen. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.75, p.129-134, 1993.

NOFTSGER, S.M.; HOPKINS, B.A.; DIAZ, D.E.; BROWNIE, C.; WHITLOW, L.W. Effect of whole and expanded-exelled cottonseed on milk yield and blood gossypol. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.2539-2547, 2000.

ODONGO, N.E.; BAGG, R.; VESSIE, G.; DICK, P.; OR-RASHID, M.M.; HOOK, S.E.; GRAY, J.T.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; MCBRIDE, B.W. Long-Term Effects of Feeding Monensin on Methane Production in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1781-1788, 2007.

ORTEGA-NIEBLAS, M.; VÁZQUEZ-MORENO, L.; ROBLES-BURGUEÑO, M.R. Protein quality and antinutritional factors of wild legume seeds from the Sonoran desert. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, 31303132, 1996.

PATRA, A.K.; YU, Z. Effects of Essential Oils on Methane Production and Fermentation by, and Abundance and Diversity of, Rumen Microbial Populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.4271-4280, 2012.

PEREIRA, M.L.A.; SILVA, L.S. **Enriched piperidine alkaloid extract from mesquite as a feed additive for ruminants**. In: BATISTA, R. (Ed.). *Prosopis: Properties, Uses and Diversity*. Nova York: Nova Publishers, 2021.

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**, v.24, p.4301-4311, 2017.

PEREIRA, T.C.J.; PEREIRA, M.L.A.; OLIVEIRA, C.A.S.; ARGÔLO, L.S.; SILVA, H.G.O.; PEDREIRA, M.S.; ALMEIDA, P.J.P.; SANTOS, A.B. Mesquite pod meal in diets for lactating goats. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.102–108, 2013.

PERNA JUNIOR, F.; VÁSQUEZ, D.C.Z.; GARDINAL, R.; MEYER, P.M.; BERNDT, A.; FRIGUETTO, R.T.S.; DEMARCHI, J.J.A.A.; RODRIGUES, P.H.M. Short-term use of monensin and tannins as feed additives on digestibility and methanogenesis in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.49, e20190098, 2020.

PIANTONI, P.; ROMAN-GARCIA, Y.; MESSMAN, M.; CANALE, C.J.; SCHROEDER, G.F. Evaluation of a new commercial source of monensin in lactating dairy cows and continuous culture fermenters. **Animal Feed Science and Technology**, v.304, 115743, 2023.

PISTELLI, G.; COSTA, C. Bactérias intestinais e obesidade. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.3, p.115-119, 2010.

RANDEL, R.D.; WILLARD, S.T.; WYSE, S.J.; FRENCH, L.N. Effect of diet containing free gossypol on follicular development, embryo recovery and corpus luteum function in Brangus heifers treated with bFSH. **Theriogenology**, v.45, p.911–922, 1996.

PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v.45, p.501-530, 1976.

RIBASKI, J.; DRUMOND, M.A.; OLIVEIRA, V.R.; NASCIMENTO, C.E.S. **Algaroba (*Prosopis juliflora*): Árvore de uso múltiplo para a região Semiárida Brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2009, 9p. (Comunicado Técnico, 240).

RICO, J.E.; SOUZA, J.; ALLEN, M.S.; LOCK, A.L. Nutrient digestibility and milk production responses to increasing levels of palmitic acid supplementation vary in cows receiving diets with or without whole cottonseed. **Journal of Animal Science**, v.95, p.436-446, 2017.

ROBINSON, P.H. Impacts of feeding monensin sodium on production and the efficiency of milk production in dairy cows fed total mixed rations: evaluation of a confounded literature. **Canadian Journal of Animal Science**, v.100, p.391-401, 2020.

RUIZ-NIETO, J.E.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; HERNÁNDEZ-MARÍN, J.; MENDONZA-CARRILLO, J.; ABRAHAM-JUÁREZ, M.; ISIODIA-LACHICA, P.M.; MIRELES-ARRIAGA, A.I. Mesquite (*Prosopis* spp.) tree as a feed resource for animal growth. **Agroforestry Systems**, v.94, p.1139-1149, 2020.

RUSSELL, J.B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1519–1525, 1987.

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

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

SANTOS, E.T.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, C.F.P.G.; 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 Science**, v.14, p.8496-8516, 2013.

SANTOS, J.R.A.; PEREIRA, M.L.A.; PEREIRA, T.C.J.; SILVA, H.G.O.; SANTOS, O.O.; CARVALHO, G.G.P.; ALMEIDA, J.R.F.A.; SILVA, R.P.; RIBAS, K.P.O. Supplementation with mesquite alkaloids extract in diets for lambs fed Bermuda grass improves growth performance. **Small Ruminant Research**, v.205, 106560, 2021.

SAUER, F.D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R.; KRAMER, J.K.G.; JACKSON, H.A.; LEE, A.J.; CHEN, S. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. **Journal of Animal Science**, v.76, p.906-914, 1998.

SAUER, F.D.J.; KRAMER, K.G.; CANTWELL, W.J. Antiketogenic effects of monensin in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.436-442, 1989.

SAWAL, R.K.; RATAN, R.; YADAV, S.B.S. Mesquite (*Prosopis juliflora*) pods as a feed resource livestock A Review. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.17, p.719-725, 2004.

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

SHEN, J.; LIU, Z.; YU, Z.; ZHU, W. Monensin and Nisin Affect Rumen Fermentation and Microbiota Differently In Vitro. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 1111, 2017.

SILVA, J.B.; BORA, P.S.; QUEIROGA NETO, V. Caracterização de Propriedades Funcionais do Isolado Protéico de sementes de Algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) DC). **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.14, p.253-272, 1996.

SILVA, S.A.; SOUZA, A.G.; CONCEIÇÃO, M.M.; ALENCAR, A.L.S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J.M.O. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**, v.24, p.460-464, 2001.

SIMJEE, S.; HEFFRON, A.; PRIDMORE, A.; SHRYOCK, T.R. Reversible monensin adaptation in *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Clostridium perfringens* of cattle origin: Potential impact on human food safety. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p.2388–2395, 2012.

SOUSA, J.E.L.; DAMASCENO, M.I.F.; SANTOS, M.N.F.; NASCIMENTO, F.C.; FERNANDES, L.E.S.; GONÇALVES, F.M. Importância da flora apícola para o desenvolvimento da apicultura no sertão central cearense. **Cadernos de Agroecologia**, v.6, p.1-5, 2011.

SOUSA, L.B.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, H.G.O.; SOUSA, L.B.; E SILVA, L.S.; MACHADO, F.S.; TOMICH, T.R.; OSS, D.B.; FERREIRA, A.L.; CAMPOS, M.M.; COSTA, I.C.; PEREIRA, L.G.R. *Prosopis juliflora* piperidine alkaloid extract levels in diet for sheep change energy and nitrogen metabolism and affect enteric methane yield. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.102, p.5132-5140, 2022.

SYMANOWSKI, J.T.; GREEN, H.B.; WAGNER, J.R.; WILKINSON, J.I.D.; DAVIS, J.S.; HIRSMSTEDT, M.R.; ALLEN, M.S.; BLOCK, E.; BRENNAN, J.J.; HEAD, H.H.; KENNELLY, J.J.; NIELSEN, J.N.; NOCEK, M.R.; VAN DER LIST, J.J.; WHITLOW, L.W. Milk production and efficiency of cows fed monensin. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.171, 1999.

SVENSSON, B.; FUKUDA, K.; NIELSEN, P.K.; BONSAGER, B.C. Proteinaceous-amylase inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1696, p.145-156, 2004.

TABOSA, I.M.; RIET-CORREA, F.; BARROS, S.S.; SUMMERS, B.A.; SIMÕES, S.V.D.; MEDEIROS, R.M.T.; NOBRE, V.M.T. Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the plant *Prosopis juliflora*. **Veterinary Pathology**, v.43, p.695-701, 2006.

TABOSA, I.M.; SOUZA, J.C.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, R.N.; GRAÇA, D.L.; RIET-CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigeminal nuclei in goats caused by the ingestion of *Prosopis juliflora* pods (mesquite beans). **Veterinary and Human Toxicology**, v.42, p.155-158, 2000.

TESEMA, B.; ANIMUT, G.; URGE, M. Effect of green *Prosopis juliflora* pods and Noug seed (*Guizotia obissynica*) Cake supplementation on digestibility and performance of Blackhead Ogaden Sheep fed Hay as a basal diet. **Science, Technology and Arts Research Journal**, v.2, p.38–47, 2013.

UGBOGU, E.A.; ELGHANDOUR, M.M.M.Y.; IKPEAZU, V.O.; BUENDÍA G.R.; MOLINA, O. M.; ARUNSI, U.O.; EMMANUEL, O.; SALEM, A.Z.M. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane

emission from livestock farming. **Journal of Cleaner Production**, v. 213, p. 915-925, 2019.

UNGERFELD, E.M. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 37, 2015.

VANCEK, M.; VIDOVÁ, M.; MAJERNÍK, A.I.; SMIGÁN, P. Methanogenesis is Ca²⁺ dependent in *Methanothermobacter thermautotrophicus* strain ΔH. **FEMS Microbiology Letters**, v.258, p.269-273, 2006.

VYAS, D.; ALEMU, A.W.; MCGINN, S.M.; DUVAL, S.M.; KINDERMANN, M.; BEAUCHEMIN, K.A. The combined effects of supplementing monensin and 3-nitrooxypropanol on methane emissions, growth rate, and feed conversion efficiency in beef cattle fed high-forage and high-grain diets. **Journal of Animal Science**, v.96, p.2923-2938, 2018.

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

WANG, W.-K.; LI, W.-J.; WU, Q.-C.; WANG, Y.-L.; LI, S.-L.; YANG, H.-J. Isolation and Identification of a Rumen Lactobacillus Bacteria and Its Degradation Potential of Gossypol in Cottonseed Meal during Solid-State Fermentation. **Microorganisms**, v.9, 2200, 2021.

WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MERTENS, D.R.; HALL, M.B. Fiber digestion, VFA production, and microbial population changes during in vitro ruminal fermentations of mixed rations by monensin-adapted and unadapted microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.169, p.68–78, 2011.

WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MERTENS, D.R.; THOMAS, E.E. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p.135-145, 2008.

XUE, D.; CHEN, H.; LUO, X. Methane Emissions Regulated by Microbial Community Response to the Addition of Monensin and Fumarate in Different Substrates. **Applied Sciences**, v.11, 6282, 2021.

ZHANG, W.J.; XU, Z.R.; PAN, X.L.; YAN, X.H.; WANG, Y.B. Advances in gossypol toxicity and processing effects of whole cottonseed in dairy cows feeding. **Livestock Science**, v.111, p.1-9, 2007.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z.; DAI, L.; LIU, Y.; CHENG, M.; CHEN, L. Isolation and characterization of a novel gossypol-degrading bacteria *Bacillus subtilis* strain Rumen Bacillus Subtilis. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.31, p.63-70, 2018.

II - OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

1. Comparar os efeitos das suplementações com extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) e com monensina (MON) em dietas com e sem caroço de algodão sobre a composição microbiana, parâmetros ruminais e perfil de ácidos graxos do leite de vacas.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar os efeitos de APA ou MON em dietas com e sem caroço de algodão sobre:

1. Os metabólitos sanguíneos, população microbiana do rúmen (contagem e identificação de protozoários ruminais, quantificação relativa de bactérias ruminais e *Archaea*, e correlação entre bactérias e protozoários ruminais), parâmetros ruminais (pH, N-NH₃, LPS e AGCC) e atividade enzimática;

2. Consumo e digestibilidade de ácidos graxos e perfil de ácidos graxos do leite.

III – CAPÍTULO 1

O EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA E A MONENSINA, EM DIETAS COM OU SEM CAROÇO DE ALGODÃO, ALTERAM OS PARÂMETROS RUMINAIS E A POPULAÇÃO MICROBIANA DO RÚMEN DE VACAS LACTANTES

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do extrato enriquecido com alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) e da monensina em dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), sobre os metabólitos sanguíneos, parâmetros ruminais, população microbiana (protozoários e bactérias) e atividade enzimática no rúmen de vacas lactantes. As dietas experimentais consistiram em: dieta controle sem aditivo; duas dietas sem CA, contendo APA (8 mg/kg MS) ou MON (15 mg/kg MS); e duas dietas com CA contendo APA (8 mg/kg MS) ou MON (15 mg/kg MS). Foram utilizadas 5 vacas mestiças Holandês x Gir (grau de sangue variando de $\frac{1}{2}$ a $\frac{3}{4}$ de sangue H x Gir), pluríparas, com produção média diária de $29,5 \pm 7,15$ kg/leite, com peso corporal médio de $487 \pm 7,25$ kg e média de 100 ± 20 dias de lactação. Foram distribuídas em delineamento quadrado latino 5 x 5, em um período experimental de 130 dias. As dietas contendo APA ou MON sem CA promoveram redução ($P < 0,05$) de colesterol total e a concentração de β -hidroxibutirato foi semelhante à dieta controle com média de 2,13 mmol/L, maior que a média (1,61 mmol/L) nas dietas APA ou MON com CA. As médias de ácidos graxos não esterificados foram maiores ($P < 0,05$) para as dietas com CA. Foi observada alteração nos parâmetros ruminais, com aumento na produção de N-NH₃ ($P < 0,0001$) nas dietas com CA e aumento ($P < 0,0001$) na produção de acetato nas dietas APA e MON sem CA. A população microbiana foi afetada pelas dietas, em que APA e MON reduziram a porcentagem de abundância relativa (%AbR) de *R. albus* ($P < 0,0001$), *S. bovis* ($P < 0,0001$), *F. succinogenes* ($P = 0,0002$) e *Archaea* metanogênica ($P < 0,0001$), e aumentaram *P. ruminicola* ($P < 0,0001$), *S. ruminantium* ($P < 0,0001$) e *M. elsdenii* ($P < 0,0001$). APA reduziu ainda a %AbR de *B. fibrisolvens* ($P = 0,0001$) e aumentou a de *R. amylophilus* ($P < 0,0001$). O extrato alcaloídico de algaroba (APA) na dose de 8 mg/kg de MS não afeta as funções renal e hepática de vacas lactantes. Dietas com APA ou monensina (MON) sem caroço de algodão (CA) reduzem colesterol total sem afetar a concentração sérica de glicose e de BHB. O CA aumenta o nível de AGNE no sangue, reduz BHB devido a um possível aumento da síntese hepática de colesterol. APA assemelha-se à MON quanto à alteração do microbioma core do rúmen, decrescendo sua diversidade por afetar *S. bovis* e as populações de bactérias fibrolíticas, *R. albus* e *F. succinogenes*, e aumentar as populações de bactérias amilolíticas, *P. ruminicola*, *S. ruminantium* e *M. elsdenii*. MON e APA reduzem a atividade de celulase do fluido ruminal, medida em fibra celulósica de papel de filtro como substrato.

Palavras-chave: AGCC, bactérias, protozoários, *Prosopis juliflora*

MESQUITE ALKALOID EXTRACT AND MONENSIN, IN DIETS WITH OR WITHOUT COTTONSEED, ALTER RUMINAL PARAMETERS AND THE MICROBIAL POPULATION OF THE RUMEN OF LACTATING COWS

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect with mesquite piperidine alkaloids (MPA) extract and monensin in diets containing or not cottonseed (CS) on blood metabolites, ruminal parameters, microbial population (protozoa and bacteria) and enzymatic activity in the rumen of lactating cows. The experimental diets consisted of: control diet without additive; two diets without CS, containing MPA (8 mg/kg DM) or MON (15 mg/kg DM); and two diets with CS containing MPA (8 mg/kg DM) or MON (15 mg/kg DM). Five crossbred Holstein x Gir cows (blood grade ranging from $\frac{1}{2}$ to $\frac{3}{4}$ of H x Gir blood), multiparous, with an average daily production of 29.5 ± 7.15 kg/milk, with an average body weight of 487 ± 7.25 kg and an average of 100 ± 20 days of lactation were used. They were distributed in a 5 x 5 Latin square design, in an experimental period of 130 days. Diets containing MPA or MON without CS promoted a reduction ($P < 0.05$) in total cholesterol and the concentration of β -hydroxybutyrate was similar to the control diet with an average of 2.13 mmol/L, higher than the average (1.61 mmol/L) in the MPA or MON diets with CS. The averages of non-esterified fatty acids were higher ($P < 0.05$) for the diets with CS. Changes in ruminal parameters were observed, with an increase in N-NH₃ production ($P < 0.0001$) in diets with CS and an increase ($P < 0.0001$) in acetate production in MPA and MON diets without CS. The microbial population was affected by the diets, in which MPA and MON reduced the percentage of relative abundance (%Rab) of *R. albus* ($P < 0.0001$), *S. bovis* ($P < 0.0001$), *F. succinogenes* ($P = 0.0002$) and methanogenic *Archaea* ($P < 0.0001$), and increased *P. ruminicola* ($P < 0.0001$), *S. ruminantium* ($P < 0.0001$) and *M. elsdenii* ($P < 0.0001$). MPA also reduced the %Rab of *B. fibrisolvens* ($P = 0.0001$) and increased that of *R. amylophilus* ($P < 0.0001$). MPA at a dose of 8 mg/kg of DM does not affect the renal and hepatic functions of lactating cows. Diets with MPA or monensin (MON) without cottonseed (CS) reduce total cholesterol without affecting the serum concentration of glucose and BHB. CA increases the level of NEFA in the blood, reduces BHB due to a possible increase in hepatic cholesterol synthesis. MPA is similar to MON regarding the alteration of the rumen core microbiome, decreasing its diversity by affecting *S. bovis* and the populations of fibrolytic bacteria, *R. albus* and *F. succinogenes*, and increasing the populations of amylolytic bacteria, *P. ruminicola*, *S. ruminantium* and *M. elsdenii*. MON and MPA reduce ruminal fluid cellulase activity measured on filter paper cellulose fiber as substrate.

Keywords: bacteria, protozoa, *Prosopis juliflora*, SCFA

1 – INTRODUÇÃO

O processo fermentativo em ruminantes é dependente de microrganismos que se relacionam de forma complexa com fatores físico-químicos ruminais, como temperatura e pH (Faniyi et al., 2019). Nesse processo, a fermentação do alimento ingerido pela microbiota ruminal, que consiste na conversão de carboidratos e proteínas em ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), é dissipado calor pela superfície corporal e são produzidos gases como gás carbônico (CO_2) e metano (CH_4). Desta forma, os ruminantes perdem de 6 a 12% de energia bruta do alimento ingerido por eructação (Johnson e Johnson, 1995), que poderia ser destinada a outros processos fisiológicos ou de produção.

Por esta razão, alguns alimentos ricos em lipídios, como o caroço de algodão (CA), e aditivos alimentares tais como os ionóforos, são utilizados para manipular o processo fermentativo e a microbiota ruminal, com o intuito de melhorar a eficiência da conversão alimentar, reduzir os gastos de energia e as produções de CO_2 e CH_4 entérico, bem como reduzir a produção de ácido acético e butírico em favor do ácido propiônico, que é mais energeticamente eficiente (Richardson et al., 1976).

A utilização de fontes lipídicas, como o CA, na dieta de ruminantes tem sido utilizada como estratégia para aumentar a densidade energética da dieta e por ser eficaz na mitigação de CH_4 em ruminantes (Martin et al., 2010; Hristov et al., 2013). Os lipídios podem inibir microrganismos ruminais, como bactérias produtoras de H_2 e protozoários, além de serem tóxicos para os metanogênicos (Martin et al., 2010), o que reduz a produção de gases e perda de energia, e torna sua utilização viável na alimentação de ruminantes

Já os ionóforos atuam no transporte de íons, através da membrana celular, o que altera o balanço químico entre o meio interno e externo da célula, causando a constante perda de energia e morte celular (Duffield, et al., 2012). De forma seletiva, os ionóforos reduzem ou inibem o crescimento de microrganismos do rúmen, são produzidos por linhagens de *Streptomyces* e foram inicialmente utilizados como coccidiostáticos para aves. A partir de 1970 começaram a ser utilizados na dieta de ruminantes como promotores de crescimento (Silva et al., 2017).

Dentre os ionóforos, a monensina sódica, um antibiótico poliéter carboxílico com massa molecular de 692 Da, é o mais utilizado pela sua eficiência de manipulação da microbiota ruminal. No entanto, apesar de sua eficiência como aditivo alimentar para ruminantes, a monensina teve seu uso banido pela União Europeia, em conformidade com o Regulamento (CE) N° 1831/2002 e com o princípio da precaução, devido à possibilidade de resistência aos antibióticos em seres humanos, e na ocorrência de resíduos em alimentos de origem animal.

Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de avaliar o efeito de extratos vegetais como alternativa ao uso de ionóforos, sobre a resposta produtiva do animal e sobre a população de microrganismos ruminais. Dentre eles, o Extrato enriquecido com alcalóides piperidínicos de algaroba (APA) tem se mostrado promissor (Brito et al., 2020; Sousa et al., 2022) por aumentar a eficiência microbiana no rúmen e de utilização da proteína dietética, e reduzir o gasto energético na forma de metano, com aumento da síntese de propionato em detrimento ao acetato e butirato.

Os APA são moléculas anfotéricas, possuem massa molecular de cerca de 630 Da e são inibidores de bactérias gram-positivas devido à ausência da membrana externa, que apresenta porinas com limite mínimo de exclusão de 600 Da (Zeth e Thein, 2010; Santos et al., 2013). Estudos (Brito et al., 2020; Oliveira et al., 2021; Sousa et al., 2022) têm demonstrado os efeitos positivos do APA na dieta de ruminantes sobre a retenção de nitrogênio, síntese microbiana e de AGCC no rúmen, desempenho produtivo e mitigador da emissão de CH₄.

De acordo com Costa (2022), níveis entre 5 e 8 mg APA/kg MS da ração para vacas em lactação, aumenta a produção de leite e o consumo de energia metabolizável, e apresenta potencial para reduzir o rendimento de metano entérico. No entanto, é importante entender as respostas fisiológicas e da microbiota ruminal à adição de APA como aditivo alimentar.

Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos das suplementações com extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA) e com monensina (MON) em dietas com e sem caroço de algodão para vacas lactantes sobre os metabólitos sanguíneos, população microbiana do rúmen, parâmetros ruminais e atividade enzimática.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Protocolo experimental

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram conduzidos de acordo com os padrões éticos de pesquisa e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme o protocolo original da EMBRAPA N° 133/2016 na data de 12 de maio de 2016 e posteriormente pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Juvino Oliveira, localizada em Itapetinga-BA, sob o N° 223/2023.

2.2. Matéria-prima vegetal e obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA)

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

As vagens foram trituradas em triturador estacionário e, em uma lona plástica, foram expostas em estufa e revolvidas diversas vezes, durante 5 dias para perda da umidade antes do início do processamento. No laboratório de Forragicultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, foram processadas em moinho de facas com utilização de peneira de 2 mm (Nogueira DPM 2), obtendo-se a farinha integral, que foi embalada em sacos de polietileno e acondicionada em freezer a -20°C para conservação.

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

No processamento do EEB, utilizaram-se soluções ácido-básicas e solventes orgânicos para isolamento de alcaloides piperidínicos, seguindo a metodologia de Ott-

Longoni et al. (1980) e para obtenção do extrato alcaloídico de algaroba (APA), procedeu-se com a metodologia de Santos et al. (2013) e INPI, 2014.

Para a produção do APA, solubilizou-se parte do EEB (100g) em solução aquosa de ácido acético 1,6 M (AcOH, 200 mL), a solução resultante foi filtrada obtendo-se a solução aquosa ácida I (SAA-I). A SAA-I foi fracionada com clorofórmio (CHCl₃), em duas lavagens sucessivas de 150 mL, obtendo-se a solução aquosa ácida II (SAA-II). A SAA-II foi alcalinizada com hidróxido de sódio (NaOH) até atingir pH 9,0, passando a ser denominada de solução aquosa básica I (SAB-I).

A SAB-I foi submetida a tripla lavagem com 100 mL de CHCl₃, obtendo-se a solução clorofórmico básico (ECB). Esta foi submetida à dupla lavagem com solução de cloreto de sódio 10% (NaCl), que posteriormente foi desidratada com 5 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄), homogeneizada e deixada em repouso durante 2 horas. Após filtração, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo e no evaporador rotativo a 57°C o clorofórmio foi evaporado, obtendo-se o extrato clorofórmico básico (ECB).

Para a quantificação do rendimento de obtenção do ECB a partir do EEB, foi considerada a quantidade de 1150 g de EEB obtendo-se em torno de 17 g de ECB seco, cujo rendimento de extração foi equivalente a 1,5%. A identificação dos principais alcaloides (Tabela 1) foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Shimadzu) e espectrometria de massas (Espectrômetro Amazon Speed ETD – Bruker).

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

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Ocorrência relativa ¹
Juliprosinina	C ₄₀ H ₇₄ N ₃ O ₂	626,49	+++
Juliprosopina	C ₄₀ H ₇₆ N ₃ O ₂	630,48	++
Prosopina	C ₁₈ H ₃₈ NO ₃	316,26	+

¹Área relativa do pico no cromatograma; ECB = extrato clorofórmico básico.

Para preparo do extrato aquoso ácido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA), utilizou-se uma balança analítica e separadamente em Erlenmeyer o ECB foi pesado, na quantidade para obtenção do seu teor na dieta. Em seguida o ECB foi solubilizado com clorofórmio, transferido para funil de decantação para lavagem com ácido clorídrico HCl 10% e obtenção da fração aquosa ácida (APA), que foi pulverizada

na mistura mineral das dietas experimentais e armazenada para fornecimento aos animais.

2.3. Local, animais e delineamento experimental

A fase experimental de campo foi conduzida na Fazenda Valeu o Boi, localizada no município de Encruzilhada – BA. O clima da região, segundo a classificação de Köppen e Geiger, é do tipo “Aw”, tropical com estações bem definidas, sob as coordenadas: latitude 15° 31’ 49” Sul, longitude 40° 54’ 37” Oeste, estando a uma altitude de 915 metros. O período de verão é quente e chuvoso, compreendendo os meses de outubro a março e o período seco e frio, correspondente de abril a setembro.

Foram utilizadas 5 vacas mestiças Holandês x Gir (grau de sangue variando de ½ a ¾ de sangue H x Gir), pluríparas, com produção média diária de $29,5 \pm 7,15$ kg/leite, com peso corporal médio de $487 \pm 7,25$ kg e média de 100 ± 20 dias de lactação no início do período experimental. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino (DQL) 5 x 5. O experimento teve duração total de 130 dias, constituído de cinco períodos experimentais, com duração de 26 dias cada, sendo os primeiros 21 dias considerados de adaptação às dietas e os cinco últimos para coleta de dados por período. Os animais foram alojados em baias individuais de 16 m², cobertas e providas de cochos e bebedouros de polietileno com capacidade de 100 litros de água, comum a duas baias, abastecidos automaticamente.

2.4. Composição das dietas experimentais e manejo alimentar

Foram utilizadas cinco dietas experimentais, sendo quatro suplementadas com APA ou monensina sódica (MON), contendo ou não caroço de algodão (CA), e uma Controle (sem aditivos e sem CA). Todas as dietas continham silagem de capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) BRS capiaçu como volumoso e palma forrageira. Os tratamentos estão descritos abaixo:

Controle = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado sem caroço de algodão (CA) e sem aditivos;

APA = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado sem CA, contendo 8 mg APA/kg de matéria seca (MS) da dieta;

APA + CA = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado com CA, contendo 8 mg APA/kg de matéria seca (MS) da dieta;

MON = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado sem CA, contendo 15 mg MON/kg de matéria seca (MS) da dieta;

MON + CA = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado com CA, contendo 15 mg MON/kg de matéria seca (MS) da dieta.

As dietas experimentais foram formuladas com base nas recomendações do NRC (2001), para atender as exigências de manutenção e produção média de 25 kg de leite por dia. As dietas foram compostas por volumoso e concentrado na proporção aproximada de 40:60, sendo a proporção expressa com base na MS (Tabela 2). Os aditivos (APA ou MON) foram adicionados à mistura mineral e as doses utilizadas estavam de acordo com recomendações de Costa (2022) para APA e do fabricante para monensina.

Tabela 2. Composição das dietas experimentais

Ingrediente	MS (g/kg MN)	Dietas (g/kg MS)				
		Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA
Silagem de capiaçu	231,40	330,58	330,58	359,32	330,58	359,32
Palma forrageira	50,00	457,28	457,28	446,03	457,28	446,03
Milho moído	875,60	167,71	167,71	114,30	167,71	114,30
Farelo de soja	875,20	37,90	37,90	23,32	37,90	23,32
Caroço de algodão	907,00	-	-	51,56	-	51,56
Mistura mineral ^a	928,20	4,08	4,08	3,98	4,08	3,98
Ureia	968,90	2,14	2,14	1,50	2,14	1,50
Fosfato Bicálcico	992,20	0,31	0,31	-	0,31	-
Nutriente						
Matéria orgânica		897,49	897,49	897,22	897,49	897,22
Proteína bruta		134,25	134,25	136,57	134,25	136,57
Extrato etéreo		52,75	52,75	60,74	52,35	60,74
Matéria mineral		100,17	100,17	101,40	100,17	101,40
FDNcp		358,79	358,79	392,41	358,79	392,41
FDA		259,60	259,60	288,64	259,60	288,64
Celulose		228,73	228,73	254,16	228,73	254,16
Hemicelulose		173,04	173,04	176,26	173,04	176,26
Lignina		30,90	30,90	34,50	30,90	34,50
Carboidratos não fibrosos		354,63	354,63	310,69	354,63	310,69
Carboidratos totais		721,70	721,70	709,77	721,70	709,77
Energia bruta (Mcal/kg)		3,90	3,90	4,08	3,90	4,08

^aMistura mineral para vacas leiteiras – Composição (mínimo): Ca: 160 g/kg; P: 85 g/kg; Na: 90 g/kg; Mg: 15 g/kg; S: 16 g/kg; Co: 70 mg/kg; Cu: 1100 mg/kg; I: 75 mg/kg; Mn: 1400 mg/kg; Se: 18 mg/kg; Zn: 4300 mg/kg; Fe: 1100 mg/kg.

2.5. Coleta de dados e análises

2.5.1. Metabolitos sanguíneos

As coletas de sangue foram realizadas no 22º dia de cada período experimental, durante a ordenha da manhã, pela veia mamária, com o auxílio de tubos Vacutainer® com separação de soro de 10 mL, devidamente identificados e posteriormente centrifugados a $2300 \times g$, a 15°C por 15 minutos. O soro foi armazenado em tubos Eppendorf® de 2 mL e conservados a -20°C para posteriores análises.

No Laboratório de Fisiologia Animal da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (LAFA/UESB), foram determinadas as concentrações de glicose, ureia, creatinina, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutamilttransferase (GGT), proteína total (PT), globulina, albumina, bilirrubina, β -hidroxibutirato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (AGNE), com o auxílio de kits comerciais da Randox (Randox Laboratories Ltd.; para determinação de AGNE) e Bioclin® (para os demais metabólitos, com exceção do BHB). As análises foram realizadas em analisador bioquímico automático (Cobas Mira Plus®, Roche Diagnostics, Indiana – EUA), com exceção do BHB, que foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Kasuki, DR-200BS-NM), com auxílio de kit comercial da Sigma-Aldrich® (MAK041).

2.5.2. Amostras de conteúdo ruminal e processamento

Foram coletadas no 26º dia de cada período experimental, amostras de conteúdo ruminal (sólido + líquido) de cada animal, via sonda esofágica, quatro horas após a alimentação da manhã, as quais foram imediatamente acondicionadas em gelo. Posteriormente, foi realizada a separação das fases sólida e líquida através da filtração por quatro camadas de gaze. Em seguida, foi medido o pH da fração líquida utilizando potenciômetro (Quimis®, modelo Q440BC, São Paulo – Brasil).

Após a filtração e determinação do pH, foram preparadas subamostras para posterior análises dos parâmetros ruminais, diversidade microbiana e atividade enzimática.

2.5.3. Parâmetros ruminais

Para determinação do nitrogênio amoniacal (N-NH₃), 40 mL do fluido ruminal de cada animal foi acidificado com 1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄; 1:1v) para cessar a

fermentação. As amostras foram armazenadas a -20°C , para posterior análise. No momento da análise, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a $3.000 \times g$ e 2 mL do sobrenadante foi pipetado e realizado a destilação com hidróxido de potássio (KOH) 2N, de acordo com metodologia descrita por Fenner (1965).

Para a análise dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), 10 mL do fluido ruminal de cada animal foi acidificado com 1 mL de ácido metafosfórico (HPO_3) a 25% e posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20°C . Para a determinação dos AGCC, aproximadamente 10 mL do fluido ruminal acidificado foi centrifugado a $5.000 \times g$ por 15 minutos, em seguida com auxílio de micropipeta, foi coletado 2 mL do sobrenadante e transferido para vial cromatográfico.

A determinação e quantificação dos AGCC (acetato, propionato, butirato, lactato, valérico, isobutirato e isovalerato) foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da Shimadzu, usando uma coluna de troca iônica Aminex HPX-87H (Bio-Rad, $300,0 \times 7,8$ mm), a 39°C . A fase móvel empregada foi solução de ácido sulfúrico (Sigma-Aldrich) 0,005N, no modo isocrático com uma vazão de 0,6 mL/min, empregando-se volume de injeção de 20 μL . Os AGCC foram analisados no comprimento de onda de 210 nm com detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD – Shimadzu SPD-M20A) em um tempo total de análise de 30 min. Todos os reagentes usados foram de grau HPLC, sendo suas soluções preparadas com água deionizada ultrapura (Tipo I). Uma mistura de AGCC com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do integrador (Campos et al., 2004). Por meio dos dados de AGCC foram estimadas as produções de CO_2 e CH_4 ruminal, utilizando-se a estequiometria de Wolin (1960), assumindo-se que o balanço da oxidação de todos os produtos ruminais é igual a zero:

$$\text{Acetato} + \text{Propionato} + \text{Butirato} + \text{CO}_2 + \text{CH}_4 = 0$$

Em que o CO_2 e o CH_4 são produzidos exclusivamente através das vias de produção do acetato e do butirato com base nas seguintes equações:

$\text{CO}_2 + \text{CH}_4 = \text{Acetato} + 2 \times \text{Butirato}$; depois de algumas substituições:

$$\text{CO}_2 = \frac{\text{Acetato}}{2} + \frac{\text{Propionato}}{4} + (1,5 \times \text{Butirato})$$

Assim, os moles de CO₂ produzidos podem ser calculados a partir da quantidade e proporção molar de acetato, propionato e butirato, e uma vez conhecidas os moles de CO₂, os moles de CH₄ podem ser calculados de acordo com a equação:

$$\text{CH}_4 = (\text{Acetato} + (2 \times \text{Butirato})) - \text{CO}_2$$

Para a determinação da concentração de lipopolissacarídeos (LPS), 15 mL de fluido ruminal de cada animal foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 6°C em tubos apirogênicos por 30 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados em novos tubos utilizando filtro de 0,22 µm, aquecidos a 100°C por 30 minutos e armazenados a -20°C para posterior análise. Ao serem descongeladas, as amostras foram diluídas em água livre de endotoxinas a aproximadamente 1:32.000 (v/v). As concentrações de LPS foram medidas espectrofotometricamente a 405 nm usando o ensaio de lisado de amebócito *Limulus* (LAL) e um leitor de microplaca com câmera de incubação, em laboratório comercial.

2.5.4. Diversidade microbiana

Para a determinação da população bacteriana, foi realizada a extração total de DNA de acordo com metodologia adaptada de Stevenson e Weimer (2007). As adaptações ocorreram no protocolo mecânico de extração, com a utilização de um moinho de bola (Marconi®, modelo MA350, São Paulo – Brasil; três vezes por 3 minutos) e no protocolo térmico, utilizando o banho-maria (Quimis®, modelo Q215S, São Paulo - Brasil; 60°C por 10 minutos, duas vezes), com alternância entre os dois protocolos. Também foi utilizado o protocolo químico, com a combinação de fenol/clorofórmio para a extração do DNA total. Ao final do processo de extração, o DNA foi precipitado com acetato e isopropanol.

Para verificar a concentração e pureza após a extração, o DNA total foi submetido a análise por espectrofotometria (NanoDrop™, modelo 2000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts – EUA) a partir das leituras de concentração (ng/µL) e das razões A_{260}/A_{280} nm e A_{260}/A_{230} nm para indicar possível contaminação do material genético com sais tampão, fenol, clorofórmio e compostos orgânicos (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade e qualidade do DNA extraído

Tratamento	Amostra	Concentração (ng/μL)	A_{260/280 nm}	A_{260/230 nm}
Controle	1	87,4	1,85	1,91
	2	30,2	1,84	2,20
	3	23,8	1,85	2,19
	4	32,0	1,91	1,63
	5	20,0	1,82	1,83
APA	1	24,1	1,83	1,94
	2	111,7	1,89	2,18
	3	62,4	1,91	1,80
	4	95,5	1,88	2,19
	5	63,9	1,82	1,94
APA+CA	1	72,6	1,85	2,11
	2	25,2	1,89	1,96
	3	25,6	1,89	1,87
	4	79,2	1,89	1,96
	5	39,7	1,85	2,05
MON	1	29,4	1,85	2,15
	2	75,9	1,90	2,02
	3	36,7	1,89	1,84
	4	43,1	1,89	1,87
	5	39,1	1,77	1,78
MON+CA	1	29,7	1,84	1,82
	2	27,2	1,78	1,59
	3	28,2	1,87	1,82
	4	25,5	1,80	1,85
	5	35,9	1,83	1,94

As amostras de DNA obtidas foram diluídas para se obter um volume final de 20 ng/ μ L, a fim de se padronizar a concentração de DNA antes da utilização nos ensaios de qPCR.

Foram selecionados primers para bactérias totais e para as espécies *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium* e *Streptococcus bovis* como espécies Gram-positivas, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amilophilus*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* como espécies Gram-negativas e *Archaea* totais produtoras de metano (Tabela 4).

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), em solução contendo 5 µL de GoTaq qPCR MasterMix (A6001 – Promega, Wisconsin, EUA), 0,5 µL de cada primer (forward e reverse (Tabela 4), 3 µL de água ultrapura (mili-Q) e 2 µL do DNA molde. As condições da termociclagem foram de 45 ciclos a 50°C por 30 segundos e a 72°C por 30 segundos. Foi utilizado um ciclo de 95°C por 10 minutos e a 95°C por 15 segundos para a desnaturação inicial. A análise de dissociação dos produtos da qPCR foi realizada a 95°C por 15 segundos, seguida do resfriamento até 60°C por 1 minuto.

Cada amostra, em duplicata, foi incluída em todas as placas além do controle negativo usando água ultrapura como molde. A detecção da fluorescência ocorre ao findarem as etapas de alongação do DNA. O número mínimo de ciclos que são necessários para que a fluorescência se torne detectável é chamado de Ct (Cycle threshold), os quais ocorrem durante a fase exponencial da reação do PCR e são utilizados nos estudos de quantificação microbiana do rúmen (Denman e McSweeney, 2005).

Para a determinação da porcentagem de presença do gene 16S rRNA da comunidade de bactérias totais e de *Archaea* do rúmen, foi feita uma relação entre o número de Ct do gene alvo e a quantidade de ciclos totais permitidos na reação de qPCR.

O Ct é a interseção entre uma curva de amplificação e uma linha limite. É uma medida relativa da concentração do alvo na reação de PCR. O valor de Ct tende a aumentar com uma quantidade decrescente do gene alvo (ThermoFisher, 2016).

A abundância relativa (AbR) dos microrganismos foi calculada por meio da equação a seguir, usando-se como normalizador o gene 16S rRNA de bactérias totais (Denman e McSweeney, 2006):

$$AbR = 100 \times 2^{\Delta Ct}$$

Onde:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{(gene alvo)}} - Ct_{\text{(normalizador)}}.$$

Tabela 4. Sequências de primers utilizados no ensaio de qPCR

Espécie	Primer set	Sequência (5'-3')	Referência
Bactérias totais	27f 342r	F: GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG R: CTGCTGCCTCCCGTAG	Khafipour et al., (2009)
<i>Archaea</i> total	MB1174f Arch1406-1389r	F: GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA R: ACGGGCGGTGTGTGCAAG	Ohene-Adjei et al. (2008)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	FibSuc3F FibSuc3R	F: GCGGGTAGCAAACAGGATTAGA R: CCCCCGGACACCCAGTAT	
<i>Ruminococcus albus</i>	RumAlb3F RumAlb3R	F: TGTTAACAGAGGGAAGCAAAGCA R: TGCAGCCTACAATCCGAACTAA	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	ButFib2F ButFib2R	F: ACCGCATAAGCGCACGGA R: CGGGTCCATCTTGTACCGATAAAT	
<i>Eubacterium ruminantium</i>	EubRum2F EubRum2R	F: CTCCCGAGACTGAGGAAGCTTG R: GTCCATCTCACACCACCGGA	
<i>Prevotella ruminicola</i>	PreRum1F PreRum1R	F: GAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTG R: CATCCTATAGCGGTAAACCTTTGG	Stevenson e Weimer (2009)
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	RumAmy2F RumAmy2R	F: CTGGGGAGCTGCCTGAATG R: GCATCTGAATGCGACTGGTTG	
<i>Streptococcus bovis</i>	StrBov2F StrBov2R	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAATAGGGGT	
<i>Selenomonas ruminantium</i>	SelRum2F SelRum2R	F: CAATAAGCATTCCGCCTGGG R: TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG	
<i>Megasphaera elsdenii</i>	MegEls2F MegEls2R	F: AGATGGGGACAACAGCTGGA R: CGAAAGCTCCGAAGAGCCT	

2.5.5. Contagem de protozoários

Para identificação dos gêneros e contagem dos protozoários foram adicionados 9 mL de solução de formaldeído (CH₂O) a 10% em 1 mL de fluido ruminal, para conservação das estruturas morfológicas dos protozoários durante o armazenamento, para posterior identificação seguindo a metodologia de Dehority (1984), com adaptações (substituição do verde brilhante pela solução de lugol) sugeridas por D'Agosto e Carneiro (1999).

No momento da identificação dos gêneros e contagem dos protozoários foram retiradas três alíquotas de 10 µL e adicionadas em lâminas de microscopia, seguida de uma gota de lugol juntamente com as lamínulas. Sob a luz de um microscópio óptico foram utilizadas as lentes objetivas de 10X e 40X para observar os indivíduos por amostras, onde a classificação dos gêneros foi realizada conforme a chave descrita por Dehority (1993).

2.5.6. Atividade enzimática

A determinação da atividade da FPase (atividade de celulase em papel de filtro) foi realizada conforme metodologia sugerida por Ghose (1987). Em tubos de ensaio, foram adicionadas tiras de papel Whatman N°1, de 1,0 x 6,0 cm e em seguida foram pipetados 0,5 mL de fluido ruminal e 1 mL de tampão citrato de sódio (50 nM; pH 4,8). A reação foi incubada em banho-maria a 39°C durante 60 minutos.

A carboximetilcelulase (CMCase) foi determinada de acordo com a metodologia adaptada de Ghose (1987). Uma solução de carboximetilcelulose 2% (p/v; Vetec, São Paulo, Brasil) foi utilizada como substrato na dosagem de CMCase. Foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL da solução de substrato, 0,5 mL de fluido ruminal e 1,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 6,8). A reação foi incubada em banho-maria a 39°C durante 60 minutos.

Para medir a atividade da xilanase, foi preparada uma mistura contendo 1 mL de tampão fosfato (0,1M; pH 6,8), 0,5 mL de fluido ruminal e 0,5 mL de xilana 0,25% (D-Xilana, Vetec, São Paulo, Brasil). A reação foi incubada em banho-maria a 39°C por 15 minutos.

Para determinação da atividade da amilase, foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL de tampão fosfato (0,1M; pH 6,8), 0,25 mL de fluido ruminal e 0,25 mL de solução de amido 0,5% (p/v). A mistura foi incubada a 39°C por 15 minutos.

A atividade da pectinase foi determinada utilizando uma mistura em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de fluido ruminal, 1,5 mL de ácido poligalacturônico 1% (p/v), 20 mM de NaCl e 0,1 MM de CaCl₂ em tampão Tris-HCl (0,05M; pH 9,5). A reação foi incubada em banho maria a 39°C durante 60 minutos.

Todas as amostras foram testadas em triplicata e 1 mL das misturas foram retiradas para determinação dos Açúcares Redutores Totais (ART) e colocados em tubos de ensaio juntamente com 1 mL do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com metodologia sugerida por Miller (1959). Os tubos foram agitados em agitador tipo

vórtex (Fisatom, modelo 772, São Paulo, Brasil) e aquecidos em banho maria a 100°C por cinco minutos. Em seguida, os tubos foram resfriados em banho de gelo por cinco minutos e adicionado 6 mL de água destilada. Os brancos de cada leitura foram realizados com os extratos enzimáticos avaliados sem a adição dos respectivos carboidratos a serem degradados. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (BEL Engineering, modelo UV-M51, Milano, Itália) a 540 nm, após o aparelho ter sido zerado com água destilada, as concentrações de glicose foram expressas em g/L. Uma unidade de atividade ou produtividade de celulase, xilanase, amilase e pectinase foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um micromol (1µmol) de glicose, xilose, amilose e ácido galacturônico por minuto (U/mL), sob as condições descritas (Miller 1959; Ghose, 1987).

A concentração de proteínas totais foi determinada empregando-se o método do Biureto (Gornall et al., 1949), onde foram adicionados 4 mL do reagente de Biureto e 1 mL do fluido ruminal em tubos de ensaio. A reação foi processada em temperatura ambiente e uma curva analítica de albumina sérica foi construída adotando-se as seguintes concentrações: 2, 4, 6, 8 e 10 mg/mL para determinar a concentração da amostra. Após a reação, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (BEL Engineering, modelo UV-M51, Milano, Itália) em comprimento de onda de 550 nm e as quantificações foram expressas em mg/mL.

2.6. Análises estatísticas

Para os dados de abundância relativa das bactérias ruminais, realizou-se avaliação das pressuposições de distribuição normal, com o teste de normalidade de resíduo Shapiro-Wilk. Os dados de todas as variáveis analisadas foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O modelo utilizado para análise dos dados, foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + C_j + P_k + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = variável dependente; μ = média das observações; D_i = efeito dos tratamentos experimentais; C_j = efeito da vaca; P_k = efeito de período; e_{ijk} = erro experimental associado a cada observação.

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do programa Statistical Analysis System (SAS OnDemand for Academics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e as médias das tabelas foram obtidas pelo comando LSMEANS e quando

significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Metabólitos sanguíneos

Os metabólitos sanguíneos (Tabela 5) não sofreram influência ($P>0,05$) das dietas experimentais, com exceção do colesterol total (CT; $P<0,0001$), do β -hidroxibutirato (BHB; $P<0,0103$) e dos ácidos graxos não esterificados (AGNE; $P=0,0048$). As dietas com CA apresentaram maiores níveis de CT no soro sanguíneo, enquanto que as dietas sem CA, contendo APA ou MON mostraram os menores níveis de CT. Independente do aditivo, as dietas sem CA mostraram maiores médias para concentração de BHB. Em contrapartida, as dietas sem CA apresentaram as menores médias para AGNE.

Tabela 5. Metabólitos do soro sanguíneo de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Metabólitos	Dietas					EPM ¹	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
Metabolismo energético e proteico							
PT ² , g/dL	8,98	8,38	8,98	8,32	8,76	0,2163	0,4832
Globulina, g/dL	4,80	4,14	4,70	4,14	4,24	0,1714	0,2255
Albumina, g/dL	4,18	4,24	4,28	4,18	4,52	0,0705	0,3075
Alb:Glob ³ , g/dL	0,89	1,08	0,92	1,08	1,08	0,0411	0,1182
Ureia, mg/dL	46,16	48,06	51,08	43,54	40,48	5,4222	0,9513
Creatinina, mg/dL	0,38	0,44	0,56	0,38	0,48	0,0490	0,3164
Glicose, mg/dL	52,54	52,46	51,98	68,38	53,68	4,2320	0,5337
TG ⁴ , mg/dL	34,44	31,48	38,36	35,18	31,14	2,0333	0,2645
Enzimas e marcadores hepáticos							
AST ⁵ , U/L	100,98	87,18	100,60	85,86	93,78	4,3369	0,1095
GGT ⁶ , U/L	134,44	122,50	134,74	124,88	151,40	8,2930	0,2903
BILT ⁷ , mg/dL	0,21	0,22	0,21	0,23	0,22	0,0072	0,7716
CT ⁸ , mg/dL	235,22 ^b	191,60 ^c	278,88 ^a	194,70 ^c	273,70 ^a	11,0394	<0,001
HDL ⁹ , mg/dL	117,99	124,55	135,51	110,32	113,40	8,7569	0,7906
LDL ¹⁰ , mg/dL	109,34	60,73	135,70	77,35	154,07	13,4917	0,0670
VLDL ¹¹ , mg/dL	7,89	6,30	7,67	7,04	6,23	0,4067	0,2645
BHB ¹² , mmol/L	0,19 ^{ab}	0,23 ^a	0,16 ^b	0,22 ^{ab}	0,16 ^b	0,0104	0,0103
AGNE ¹³ , mmol/L	0,18 ^b	0,21 ^{ab}	0,25 ^{ab}	0,17 ^b	0,29 ^a	0,0115	0,0048

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$); ¹Erro padrão da média; ²Proteína total; ³Razão entre albumina e globulina; ⁴Triglicerídeos; ⁵Aspartato aminotransferase; ⁶ γ -glutamilttransferase; ⁷Bilirrubina total; ⁸Colesterol total; ⁹Lipoproteína de alta densidade; ¹⁰Lipoproteína de baixa densidade; ¹¹Lipoproteína de muita baixa densidade; ¹² β -hidroxibutirato; ¹³Ácidos graxos não esterificados.

Antes dos sinais clínicos da cetose aparecerem, pode ser detectado aumento no nível de BHB e AGNE. As concentrações circulantes de AGNE e BHB atualmente constituem os biomarcadores padrão da indústria para a detecção de comprometimento metabólico durante o período periparto (McArt et al., 2013). Níveis elevados de AGNE causam estresse oxidativo e consequentemente cetose, decorrente da apoptose de hepatócitos e a geração de espécies reativas de oxigênio (ESO), o que resulta em desequilíbrio entre espécies oxidativas e antioxidantes (Li et al., 2020). Apesar dos valores de AGNE terem sido maiores nas dietas com CA, todas as dietas apresentaram médias consideradas adequadas para vacas em lactação saudáveis (<0,5 mmol/L), de acordo com Li et al. (2016).

Já os valores de BHB, associados aos níveis de glicose sanguínea, mostraram que os animais estavam em quadro saudável, com ausência de casos de cetose, em que os sinais clínicos podem ser observados quando o BHB ultrapassa 1,0 mmol/L e a glicemia cai do normal de 50-70 mg/L para 20-40 mg/L (González, 2018). A glicemia manteve-se dentro dos valores de referência, indicando que as dietas proporcionaram uma provisão fisiológica basal de glicose. Da mesma forma, os valores de BHB estão de acordo com os reportados no Brasil e considerados normais, de até 0,5 mmol/L em vacas Girolando (Zambrano e Marques Jr., 2009).

A gliconeogênese depende de um adequado funcionamento do fígado, que pode ser evidenciado pelos níveis normais das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e γ -glutamilttransferase (GGT), que são indicadoras da função hepática em conjunto com a glicose. Os níveis de albumina e de CT também podem indicar atividade hepática, devido à diminuição desses metabólitos em caso de fígado gorduroso (González, 2018).

A albumina apresentou valores dentro da referência e o CT foi mais elevado na presença de CA. Possivelmente, CA na ração favoreceu a lipogênese e, na ausência de CA, os aditivos APA ou MON aumentaram a utilização lipídica sem alteração na formação de BHB. O CT está acima do valor de referência em vacas Holandesas lactantes que é de 133,50 mg/dL (Pogliani e Birgel Junior, 2007) e do valor médio de 63,3 mg/dL encontrado em vacas lactantes com fígado gorduroso (Takahashi et al., 2021). Consistentemente, a concentração de BHB mostrou valor médio menor que 1,0 mmol/L de vacas lactantes com esteatose hepática (Takahashi et al., 2021).

3.2. Características fermentativas no rúmen

As dietas experimentais influenciaram ($P < 0,05$) a concentração de $N-NH_3$, em que a dieta APA+CA apresentou a maior média (20,18 mg/dL) para este parâmetro (Tabela 6). As dietas com aditivos sem CA (APA e MON) apresentaram as menores médias para $N-NH_3$ e não diferiram da dieta controle. As concentrações de acetato foram influenciadas ($P < 0,0001$) pelas dietas experimentais, em que as dietas APA (35,64 mmol/L) e MON (33,39 mmol/L) apresentaram as maiores concentrações. Foram identificadas as menores produções de acetato nas dietas que continham CA, que não diferiram da dieta controle. Os demais AGCC não foram afetados ($P > 0,05$) pelas dietas.

A dieta MON apresentou a maior média ($P = 0,0483$) para a razão acetato:propionato com valor de 45% a mais do que a dieta MON+CA, que apresentou a menor média (Tabela 6). Para o somatório das concentrações de AGCC, as dietas sem CA com APA ou MON também apresentaram as maiores ($P = 0,0012$) concentrações, com diferença de 11,6% entre as respectivas médias. Em contrapartida, as dietas contendo CA apresentaram os menores somatórios para AGCC e não diferiram da dieta controle.

Para as estimativas de CO_2 ($P = 0,0313$) e CH_4 ($P = 0,0005$), as dietas APA e MON apresentaram as maiores concentrações, com diferença de 11% e 5,1% entre as respectivas médias. Entretanto, as dietas contendo CA apresentaram as menores médias para as mesmas variáveis (Tabela 6).

Tabela 6. Potencial hidrogeniônico (pH), concentrações de N-amoniaco (N-NH₃), Lipopolissacarídeos (LPS), ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e estimativa da produção de dióxido de carbono (CO₂) e metano (CH₄) em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Variável	Dietas					EPM ¹	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
Parâmetros ruminais							
pH	6,98	6,84	6,79	6,91	7,06	0,0610	0,6364
N-NH ₃ (mg/dL)	10,39 ^c	14,01 ^{bc}	20,18 ^a	12,45 ^{bc}	14,12 ^b	0,7524	<0,0001
LPS (log ₁₀ UI/mL)	5,04	5,05	5,02	5,02	5,03	0,0089	0,6949
Concentração de AGCC (mmol/L)							
Acetato	25,47 ^b	35,64 ^a	26,13 ^b	33,39 ^a	21,95 ^b	1,2012	<0,0001
Propionato	6,38	9,24	6,89	6,54	7,13	0,3321	0,0585
Butirato	5,72	6,86	4,47	5,82	4,96	0,4855	0,6753
Isobutirato	0,54	0,55	0,43	0,63	0,42	0,0327	0,3075
Valerato	1,61	1,58	1,67	1,55	1,14	0,0889	0,4858
Isovalerato	1,27	1,24	1,00	1,22	1,04	0,0480	0,2296
Lactato	0,26	0,24	0,23	0,23	0,24	0,0051	0,6437
Proporção e somatório de AGCC (mmol/L)							
A:P	3,98 ^{ab}	3,92 ^{ab}	3,91 ^{ab}	5,69 ^a	3,13 ^b	0,2768	0,0483
P:B	1,25	1,42	1,63	1,37	1,53	0,0783	0,6960
∑ A:P:B	37,57 ^{bc}	51,74 ^a	37,49 ^{bc}	45,76 ^{ab}	34,05 ^c	1,6429	0,0012
∑ Ib:V:Iv	3,42	3,37	3,10	3,40	2,60	0,1070	0,1143
Estimativa da produção de CO ₂ e CH ₄ (mmol/L)							
CO ₂	22,91 ^{ab}	30,42 ^a	21,49 ^{ab}	27,07 ^{ab}	20,20 ^b	1,1421	0,0313
CH ₄	14,00 ^{bc}	18,94 ^a	13,58 ^c	17,97 ^{ab}	11,67 ^c	0,6760	0,0005
CH ₄ /∑ A:P:B	0,37 ^{ab}	0,37 ^{ab}	0,36 ^{ab}	0,39 ^a	0,34 ^b	0,0048	0,0260
CH ₄ /∑ A:B	0,45 ^{ab}	0,44 ^{ab}	0,44 ^{ab}	0,46 ^a	0,43 ^b	0,0023	0,0269

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹Erro padrão da média; A – Acetato; P – Propionato; B – Butirato; V – Valerato; Ib – Isobutirato; Iv – Isovalerato.

O pH do ambiente ruminal não foi influenciado pelas dietas experimentais e se manteve entre 6,79 e 7,06. De acordo com Dehority (2004), o pH entre 5,5 e 7,0 indica condições normais do rúmen e favorece a multiplicação dos microrganismos ruminais. O autor relatou ainda que o pH atinge o valor de 5,5 de duas a seis horas após a alimentação, em virtude da maior produção de ácidos decorrente da fermentação, o que tem como consequência a diminuição da população de protozoários. No presente estudo, a aferição do pH foi realizada quatro horas após a alimentação e foi considerada adequada para as condições ruminais, e estão de acordo com Pereira et al. (2017), que encontraram valores semelhantes em testes *in vitro* utilizando APA. Da mesma forma,

Costa (2022) não identificou influência dos níveis de APA sobre o pH ruminal de vacas em lactação.

Vale salientar que a eficácia de ação do APA pode estar relacionada com o pH ruminal, uma vez que o pH do meio influencia as moléculas ativas de alcaloides piperidínicos, podendo estar no estado dissociado (hidrofílico) ou não dissociado (hidrofóbico). No caso do APA, o pH mais baixo permite que as moléculas de APA estejam na forma hidrofílica, o que favorece a interação com as membranas celulares de bactérias Gram-positivas através dos canais de cálcio, gerando o efeito antimicrobiano (Choudhary et al., 2005; Pereira et al., 2017). Além do pH, outros fatores como dieta, método de extração e preparo do aditivo, também influenciam o seu mecanismo de ação (Patra e Saxena, 2010).

Foi observado aumento na concentração de N-NH₃ (mg/dL) com o uso dos aditivos, com destaque para APA+CA que apresentou a maior média (20,18 mg/dL). Os valores encontrados no presente estudo para a concentração de N-NH₃ são considerados ideais para uma fermentação ruminal adequada, que segundo Leng (1990), deve ser superior a 10 mg/dL.

O N-NH₃ pode ser utilizado pelas bactérias ruminais para síntese de proteína microbiana (Pmic) ou ser absorvido pela corrente sanguínea e levado até o fígado, onde será convertido em ureia, com gasto de energia associado. A ureia pode ser reciclada pela saliva, parede gastrointestinal, secretada no leite e excretada pela urina (Van Soest, 1994; Butler, 1998). De acordo com Gomes et al. (2016), o pico da concentração de N-NH₃ ocorre entre 3 e 6 horas após a alimentação e reduz entre 6 e 18 horas devido a sua utilização pelas bactérias ruminais para síntese de Pmic.

Estudos têm demonstrado a ausência de efeito direto da monensina sobre a concentração ruminal de N-NH₃ (Oelker et al., 2009; Santos et al., 2019). Entretanto, estudos que utilizaram CA na dieta de vacas em lactação reforçaram o efeito de fontes lipídicas sobre a concentração de N-NH₃ ruminal e relataram aumento causado pela liberação da proteína do CA (Patra, 2014; Nogueira et al., 2020). No presente estudo, a maior média atribuída à concentração de N-NH₃ na dieta APA+CA, possivelmente se deu por conta do aumento da desaminação de aminoácidos favorecida pelo APA em conjunto com o CA, uma vez que a dieta MON+CA não mostrou a mesma resposta.

Os resultados apresentados para N-NH₃ estão de acordo com Costa (2022), que apesar de não ter apresentado diferença significativa, identificou aumento de

aproximadamente 13% na concentração de N-NH₃ em vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo CA e APA (10 mg/kg MS), em relação ao controle (sem APA).

A concentração ruminal de lipopolissacarídeos (LPS) não foi influenciada pelas dietas experimentais, com média variando entre log₁₀ 5,02 (104.100) UI/mL para as dietas APA+CA e MON e, log₁₀ 5,05 (111.360) UI/mL para a dieta APA. Os LPS são endotoxinas que fazem parte da parede celular de bactérias Gram-negativas e desempenham um papel importante em vários distúrbios e na resposta inflamatória em ruminantes (Reisinger et al., 2021). Os valores encontrados no presente estudo estão acima do relatado por Gozho et al. (2007) para vacas saudáveis (log₁₀ 4,39 UI/mL), no entanto, encontram-se abaixo do valor relatado para vacas com acidose subclínica (log₁₀ 5,11 UI/mL).

De acordo com Gozho et al. (2007) a alimentação com dietas ricas em concentrado aumenta os LPS no rúmen quando comparado com animais alimentados a pasto. E sua magnitude de resposta depende do nível de concentrado da dieta e provavelmente por quanto tempo essas dietas são fornecidas antes de induzir a acidose subclínica. No presente estudo, os animais receberam dietas com aproximadamente 60% de concentrado, o que provavelmente contribuiu para o aumento da concentração de LPS em conjunto com os aditivos que favorecem a abundância de bactérias Gram-negativas. Entretanto, os aditivos ao promoverem a alteração do microbioma ruminal mantiveram a estabilidade dos indicadores de doenças associadas à elevação de ácido lático, BHB e LPS.

As concentrações de acetato foram maiores para APA e MON. Em contrapartida, a concentração de propionato na dieta APA foi de aproximadamente 31% a mais do que o controle e 29% a mais do que a dieta MON, o que resultou em uma razão acetato:propionato para a dieta APA semelhante às demais, com exceção da dieta MON, que apresentou a maior razão. O acetato é o principal AGCC produzido no rúmen e é responsável por fornecer 50% da energia produzida pelos AGCC, além de ser a principal fonte de energia e substrato para a síntese de gordura do leite em vacas leiteiras (Bergman, 1990; Urrutia et al., 2019; Cheng, et al., 2022).

O uso de APA e de MON elevou a produção de acetato, porém quando associado com CA esse acréscimo não foi observado, apesar de não observar diferença significativa na produção de propionato e butirato, a somatória (Σ A:P:B) mostra que a utilização de APA aumenta a produção de AGCC, porém a associação com CA reduz esse efeito.

Apesar de não ter apresentado diferença estatística, a concentração de butirato na dieta APA foi de aproximadamente 17% maior do que a dieta controle e 15% a mais do que a dieta MON. Vale salientar que para vacas leiteiras em lactação, o butirato é usado para a síntese *de novo* de ácidos graxos na glândula mamária (Dils, 1986) e uma maior concentração ruminal implica em aumento no teor da gordura do leite (Izumi et al., 2019).

Devido à maior concentração de acetato e de propionato, o somatório dos principais AGCC foi maior na dieta APA. O aumento da concentração dos ácidos graxos no ambiente ruminal, assim como aumento de lactato, pode acarretar em redução do pH (Aschenbach et al., 2011; Fregulia et al., 2021). No entanto, no presente estudo, não foi identificado aumento da concentração de lactato, que tem o pKa mais baixo e possui um maior potencial acidificante do que os AGCC. Além disso, as concentrações molares de AGCC estiveram dentro dos padrões esperados, que de acordo com Coelho da Silva e Leão (1979) é de 54 a 74% para acetato, 16 a 27% para propionato e 6 a 15% de butirato.

Conseqüentemente ao aumento da fermentação ruminal mostrado pela concentração molar de AGCC, as produções de CO₂ e CH₄ foram mais intensas nas dietas APA e MON, no entanto, não diferiram do controle para concentração de CO₂. Foi observada redução da concentração molar de CH₄ nas dietas com CA, o que é explicada pela capacidade dos lipídios presentes no CA em inibir a metanogênese por meio da redução do metabolismo e do número de metanogênicos e/ou protozoários, além de não serem fermentados no rúmen e, portanto, não liberarem hidrogênio livre (Nogueira et al., 2020).

O aumento da concentração molar de CH₄ nas dietas APA e MON é explicado pela maior produção de acetato, uma vez que a via do acetato libera mais H₂ que é utilizado pelos metanogênicos para reduzir CO₂ em CH₄ (Nogueira et al., 2020). Por outro lado, a razão da concentração de AGCC por CH₄ foi semelhante entre as dietas APA, MON e controle, sendo que MON associada ao CA mostrou menor proporção de CH₄ produzido, comparada à dieta MON sem CA. Isso pode ser explicado pela menor razão acetato:propionato.

Os resultados do presente estudo para concentrações molares de CO₂ e CH₄ vão em contrapartida de trabalhos que demonstraram o efeito da monensina como mitigador. No entanto, a literatura relata que esse efeito pode ser dependente da dose fornecida,

consumo de ração e composição da dieta, além de possivelmente ser um efeito temporário, o que pode causar inconsistência dos resultados (Hristov et al., 2013).

3.3. População microbiana do rúmen

3.3.1. Contagem e identificação de protozoários ruminais

Foi observada a ocorrência de protozoários ciliados das ordens Vestibuliferida e Entodiniomorphida em todas as dietas experimentais (Tabela 7). Foi identificada a presença da família Isotrichidae, composta pelos gêneros *Dasytricha* e *Isotricha* na ordem Vestibuliferida, e na ordem Entodiniomorphida, as famílias Ophryoscolecidae (os gêneros *Entodinium*, *Diplodinium*, *Eodinium*, *Eremoplastron*, *Eudiplodinium*, *Diploplastron*, *Polyplastron*, *Metadinium* e *Epidinium*) e a Blepharocorythidae (o gênero *Charonina*) (Kittelman et al., 2015).

O gênero *Polyplastron* foi identificado apenas na dieta MON, assim como o gênero *Metadinium* foi identificado apenas na dieta APA. A dieta MON foi a única que não apresentou o gênero *Diploplastron*, bem como o gênero *Charonina*, que não foi identificado no controle e MON+CA. Já o gênero *Epidinium* foi identificado apenas nas dietas APA e MON+CA (Tabela 7).

Tabela 7. Ordem, família e gênero de protozoários ciliados ruminais encontrados em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Gêneros	Dietas				
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA
Vestibuliferida					
Isotrichidae					
<i>Isotricha</i>	+	+	+	+	+
<i>Dasytricha</i>	+	+	+	+	+
Entodimorphida					
Ophryoscolecidae					
<i>Entodinium</i>	+	+	+	+	+
<i>Diplodinium</i>	+	+	+	+	+
<i>Eodinium</i>	+	+	+	+	+
<i>Eremoplastron</i>	+	+	+	+	+
<i>Eudiplodinium</i>	+	+	+	+	+
<i>Diploplastron</i>	+	+	+		+
<i>Polyplastron</i>				+	
<i>Metadinium</i>		+			
<i>Epidinium</i>		+			+
Blepharocorythidae					
<i>Charonina</i>		+	+	+	

+: presença do gênero em pelo menos um animal.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) das dietas experimentais sobre os gêneros nem sobre a população total de protozoários ruminais (Tabela 8).

Tabela 8. Concentrações ($\times 10^3/\text{mL}$ de líquido ruminal) e composição relativa de protozoários ciliados no líquido ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Gêneros	Dietas					EPM ¹	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
Concentração ($\times 10^3/\text{mL}$ de líquido ruminal)							
<i>Isotricha</i>	6,20	2,93	1,60	3,33	0,60	0,9413	0,1869
<i>Dasytricha</i>	1,47	1,20	1,67	1,40	1,60	0,3471	0,9941
<i>Entodinium</i>	58,80	93,60	60,00	85,60	50,20	13,3494	0,7358
<i>Diplodinium</i>	6,53	4,33	4,00	2,80	3,53	0,8920	0,3723
<i>Eodinium</i>	19,73	18,87	16,27	22,20	10,40	3,4315	0,1977
<i>Eremoplastron</i>	6,93	5,07	2,33	10,33	2,60	1,7531	0,6040
<i>Eudiplodinium</i>	7,33	0,53	0,33	2,07	1,87	1,4046	0,5330
<i>Diploplastron</i>	0,13	0,33	0,07	-	0,47	0,1017	0,5053
<i>Polyplastron</i>	-	-	-	0,20	-	0,0400	0,4449
<i>Metadinium</i>	-	0,07	-	-	-	0,0132	0,4449
<i>Epidinium</i>	-	0,47	-	-	1,00	0,2171	0,4449
<i>Charonina</i>	-	0,13	1,73	0,07	-	0,3464	0,4449
Total identificado	107,13	127,53	88,00	128,00	72,29	15,6540	0,6477
Composição relativa (%)							
<i>Isotricha</i>	4,83	2,65	1,00	2,04	1,54	0,6803	0,2394
<i>Dasytricha</i>	2,00	1,05	1,07	1,25	2,14	0,2873	0,6751
<i>Entodinium</i>	47,29	63,34	63,02	57,96	62,06	5,7549	0,0936
<i>Diplodinium</i>	5,87	4,42	4,32	2,10	4,26	0,8632	0,5667
<i>Eodinium</i>	27,74	21,97	26,22	29,17	18,94	4,5553	0,8727
<i>Eremoplastron</i>	6,13	4,69	1,76	6,02	4,11	0,9917	0,5891
<i>Eudiplodinium</i>	6,06	0,55	0,31	1,24	3,60	1,0257	0,2358
<i>Diploplastron</i>	0,08	0,34	0,07	-	1,06	0,2138	0,4655
<i>Polyplastron</i>	-	-	-	0,10	-	0,0197	0,4449
<i>Metadinium</i>	-	0,07	-	-	-	0,0143	0,4449
<i>Epidinium</i>	-	0,72	-	-	2,27	0,4711	0,4449
<i>Charonina</i>	-	0,21	2,22	0,12	-	0,4442	0,4449

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹Erro padrão da média.

A população dos gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium* e *Eudiplodinium* apresentaram correlação positiva de intensidade média (60,68, 62,85, 56,77, 46,41 e 53,55%) com o gênero *Eremoplastron* (Tabela 9). Os gêneros *Dasytricha*, *Diplodinium* e *Eodinium* também apresentaram correlação positiva de intensidade média (55,72, 46,75 e 52,72%) com o gênero *Isotricha*, assim como os gêneros *Entodinium* e *Diplodinium*, com o gênero *Dasytricha* (57,78 e 46,15%). Em contrapartida, o gênero *Epidinium* apresentou correlação negativa de intensidade baixa

(-39,74%) com o gênero *Diplodinium* e correlação positiva de intensidade média (55,03%) com o gênero *Diploplastron*, juntamente com o gênero *Metadinium* (41,61%).

Tabela 9. Coeficientes de correlação de Spearman entre os gêneros de protozoários ciliados ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Gêneros	<i>Isotricha</i>	<i>Dasytricha</i>	<i>Entodinium</i>	<i>Diplodinium</i>	<i>Eodinium</i>	<i>Eremoplastron</i>	<i>Metadinium</i>	<i>Epidinium</i>
Total	0,5830***	0,6957**	0,8917*	0,5976***		0,6870**		
<i>Isotricha</i>		0,5572***		0,4675****	0,5272***	0,6068****		
<i>Dasytricha</i>			0,5778***	0,4615****		0,6285**		
<i>Entodinium</i>						0,5677***		
<i>Diplodinium</i>						0,4641****		-0,3974****
<i>Eudiplodinium</i>						0,5355***		
<i>Diploplastron</i>							0,4161****	0,5503***

Significativo * (P<0,0001); ** (P<0,001); *** (P<0,01); **** (P<0,05).

Os protozoários apresentam influência direta na fermentação ruminal por meio do controle do pH, síntese de AGCC e amônia, e controle populacional de bactérias ruminais (Williams e Coleman, 1997) e, a abundância dos gêneros no ambiente ruminal é dependente de vários fatores como pH, idade do animal, dieta (Castillo-Lopez e Domínguez-Ordóñez, 2019; Huuki et al., 2022), dentre outros. No presente estudo, apesar da diferença numérica entre as concentrações de protozoários (Tabela 7), as dietas não apresentaram diferença ($P > 0,05$), o que pode ser explicado devido à alta dispersão desses dados e à sua natureza composicional, que geram problemas na análise estatística. O gênero *Entodinium* foi predominante em todas as dietas, com composição relativa variando de 47,29 a 63,34% seguido do gênero *Eodinium*, com variação de 18,94 a 29,17%.

A abundância do gênero *Entodinium* é característica de bovinos leiteiros alimentados com dietas ricas em grãos e é classificado como um gênero amilolítico (Hook et al., 2011; Zhang et al., 2017) e resistente, por tolerar redução do pH até 5.3 (Dehority, 2005). Já o Gênero *Eodinium* é mais abundante em animais alimentados com dietas fibrosas (Santos et al., 2015) e é caracterizado como um gênero celulolítico (Coppo et al., 2003) importante para a degradação da celulose presente no volumoso. A predominância do gênero *Entodinium* e *Eodinium*, no presente estudo, está de acordo com pesquisas que avaliaram a população de protozoários ruminais em animais que receberam dietas mistas (Duarte et al., 2018; Park et al., 2020).

Apesar da falta de efeito significativo das dietas sobre a concentração de protozoários ruminais, foi observada uma redução na população de Holotrich (*Isotrichia* + *Dasytricha*) nos animais suplementados com os aditivos, com destaque para as dietas contendo CA, em que a redução foi de 57,37% para APA+CA e de 71,32% para MON+CA. Estes resultados estão de acordo com Dayani et al. (2007) que relataram redução na população de protozoários ruminais em ovinos alimentados com dietas contendo CA, principalmente Holotrich e protozoários celulolíticos.

Estudos de Ríspoli et al. (2009) e Veloz (2023) relataram a influência inibitória da monensina e do CA sobre a concentração ruminal dos gêneros de protozoários. A monensina inibe a proteólise dentro das vesículas de armazenamento dos protozoários ciliados do rúmen, o que resulta na interrupção da digestão de nutrientes e diminui a taxa de crescimento (Sylvester et al., 2009). Já o CA é rico em lipídios, principalmente o ácido linoleico (C18:2), que é tóxico para os protozoários (Newbold e Chamberlain, 1988), uma vez que apresentam capacidade limitada de absorver e transformar lipídios

(Dayani et al., 2007; Tripathi et al., 2014). No entanto, assim como no presente estudo, os gêneros *Entodinium* e *Eodinium* têm se mostrado resistentes ao efeito inibitório dos aditivos alimentares e do CA em estudos anteriores (Dayani et al., 2007; Koza, et al., 2015; Reis et al., 2019).

O gênero *Polyplastron*, celulolítico, foi identificado apenas na dieta MON (Tabela 7). Este gênero é característico de animais de baixa eficiência, alimentados com dietas predominantemente compostas por carboidratos fibrosos (Fregulia et al., 2022). No presente estudo, as dietas experimentais foram compostas predominantemente por concentrado, com relação volumoso:concentrado de aproximadamente 40:60, o que explica a baixa composição relativa ou ausência dos gêneros celulolíticos e maior presença dos gêneros amilolíticos.

Já o gênero *Metadinium* foi encontrado apenas na dieta APA. Apesar da baixa composição relativa deste gênero no presente estudo, a sua presença está relacionada a animais de alta eficiência alimentar (Fregulia et al., 2022), o que reforça o efeito do aditivo sobre a eficiência alimentar de ruminantes. Este resultado está de acordo com Sousa (2019) que identificou a presença do gênero *Metadinium* em cordeiros suplementados com APA. A presença do gênero *Metadinium* no presente estudo, assim como nos estudos de Sousa (2019) e Fregulia et al. (2002) em animais de alta eficiência, abrem o questionamento sobre a relação entre protozoários deste gênero e eficiência alimentar. Essas informações ainda são insuficientes e indicam a necessidade de mais estudo sobre a função do gênero *Metadinium* no metabolismo ruminal de vacas, porém, estudos mostraram ação celulolítica por ingerirem muitos fragmentos de plantas no rúmen de caprinos e ovinos (Hungate, 1966; Imai 1988; Güreli et al., 2016).

O gênero *Epidinium* foi identificado apenas nas dietas APA e MON+CA, com abundância relativa de 0,72 e 2,27%, respectivamente. A presença deste gênero no rúmen está relacionada com o aumento na produção de metano por abrigar *Archaea* metanogênicas intra e extracelulares (Newbold et al., 1995; Lloyd et al., 1996; Bach et al., 2023), e com a redução da eficiência alimentar (Bach et al., 2023). No presente estudo, a presença do gênero *Epidinium* na dieta MON+CA não refletiu em aumento na produção de CH₄. No entanto, a dieta APA apresentou a maior concentração de CH₄. O que indica que o efeito do CA superou a influência do gênero *Epidinium*, na produção de CH₄.

O gênero *Charonina* foi identificado somente nas dietas contendo APA (APA e APA+CA) e na dieta MON. A presença deste gênero no ambiente ruminal é mais visível

em animais jovens e/ou alimentados a pasto (Duarte et al., 2018). No entanto, sua presença está relacionada também com a saúde do rúmen (Duarte et al., 2018), o que sustenta a hipótese de que o APA, assim como a MON, favorece o ambiente ruminal, uma vez que os animais do presente estudo estavam na fase adulta e receberam dietas mistas (volumoso + concentrado).

O gênero *Eremoplastron* apresentou correlação positiva de intensidade média com os gêneros *Isotricha*, *Dasytricha*, *Entodinium*, *Diplodinium* e *Eudiplodinium* (Tabela 8), o que significa que esses gêneros possuem 60,68, 62,85, 56,77, 46,41 e 53,55% de chances de ocorrerem juntos no conteúdo ruminal de vacas em lactação. Estes gêneros, com exceção do *Eudiplodinium*, são classificados como predominantes em bovinos (Salvio e Agosto, 2001).

Isotricha apresentou ainda correlação positiva de intensidade média com *Dasytricha* (55,72%; ambos Holotrich), *Diplodinium* (46,75%) e *Eodinium* (52,72%), o que demonstra contribuição entre os gêneros de protozoários celulolíticos. O gênero *Diplodinium*, além de apresentar correlação positiva de intensidade média com o gênero *Eremoplastron*, apresentou também com *Dasytricha* (46,15%). No entanto, apresentou correlação negativa de intensidade média com o gênero *Epidinium*, o que indica que o crescimento de um desfavorece o do outro em -39,74%. Os gêneros *Diplodinium* e *Epidinium* são mais comumente encontrados em animais que recebem dietas com alto teor de fibra, pois ambos apresentam enzimas que auxiliam na degradação do material fibroso (Jouany, 1996). Esta correlação negativa sugere uma possível competição pelo substrato entre os gêneros *Diplodinium* e *Epidinium*, uma vez que os teores de fibra das dietas experimentais não foram altos.

3.3.2. Quantificação relativa de bactérias ruminais e correlação entre bactérias e protozoários

Como observado na Figura 1, houve redução ($P < 0,0001$) na porcentagem de abundância relativa (%AbR) de *Archaea* metanogênica nas dietas APA (42,41%), MON (30,34%) e MON+CA (17,71%), em comparação com o controle (64,66%).

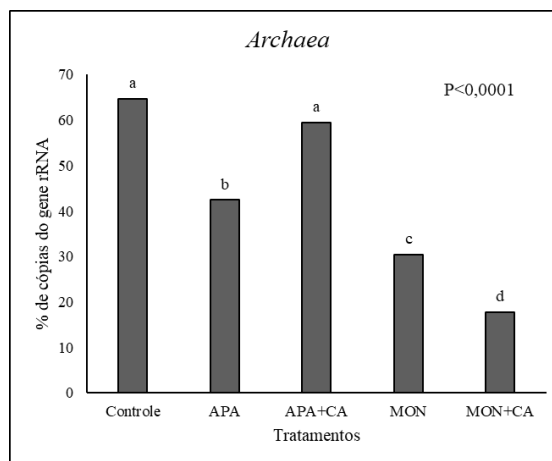


Figura 1

Figura 1. Valores médios da abundância relativa de *Archaea* total em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON. As populações são expressas como porcentagens do número de cópias do gene 16S rRNA do total de Ct. Dentro de cada painel, diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

As dietas experimentais afetaram ($P<0,05$) a população de bactérias ruminais (Figuras 2 e 3), em que as dietas suplementadas com APA ou MON, sem CA, proporcionaram menores porcentagens de abundância relativa (%AbR) para as espécies *R. albus* ($P<0,0001$), *S. bovis* ($P<0,0001$) e *F. succinogenes* ($P=0,0002$). Para a espécie *B. fibrisolvens*, a dieta APA reduziu ($P=0,0001$) a %AbR, mas não houve diferença entre as demais dietas. Em contrapartida, para as espécies *P. ruminicola* ($P<0,0001$), *R. amylophilus* ($P<0,0001$), *S. ruminantium* ($P<0,0001$) e *M. elsdenii* ($P<0,0001$), as dietas APA e MON apresentaram médias superiores à dieta controle.

Para *E. ruminantium*, as dietas APA e MON não diferiram da dieta controle, contudo a presença de CA promoveu aumento de sua abundância, sendo maior ($P<0,0001$) quando associado à MON. Para as dietas com CA houve diferenças entre os aditivos APA e MON. A dieta APA+CA apresentou maior %AbR para população de *R. Amylophilus* ($P<0,0001$), *M. elsdenii* ($P<0,0001$) e menor para *R. albus* ($P<0,0001$), *S. bovis* ($P<0,0001$) e *S. ruminantium* ($P<0,0001$) (Figuras 2 e 3).

As comparações entre os efeitos dos aditivos, associados ou não ao CA sobre a %AbR das bactérias ruminais estudadas e *Archaea* encontram-se representadas na Tabela 10.

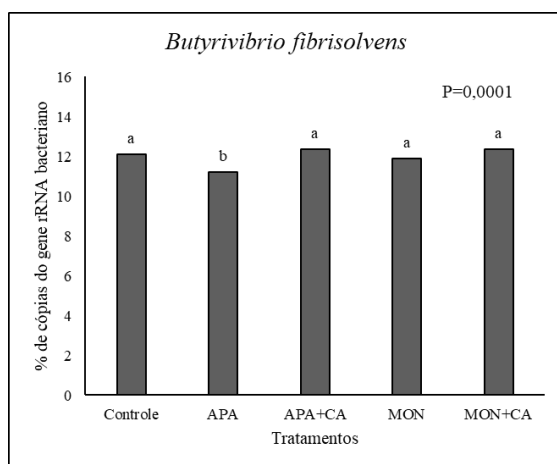
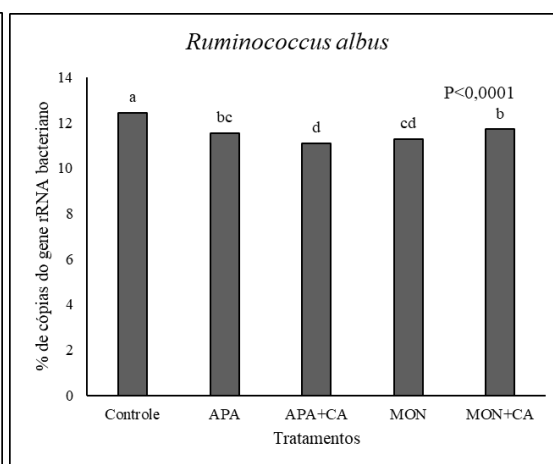
Figura 2^a

Figura 2B

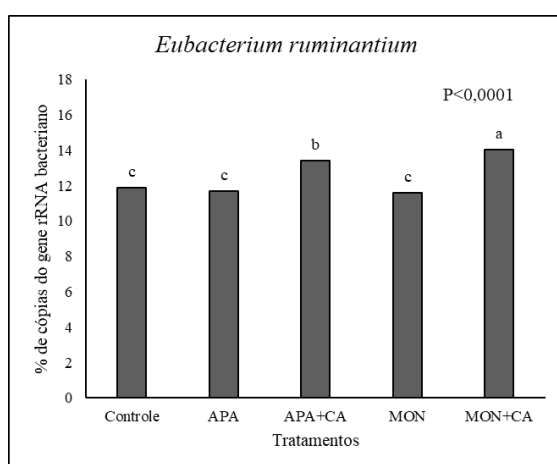


Figura 2C

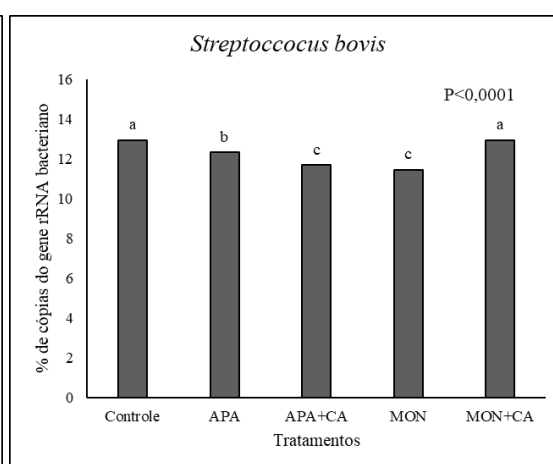


Figura 2D

Figura 2. Valores médios de abundância relativa de espécies bacterianas ruminais Gram-positivas em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON. As populações são expressas como porcentagens do número de cópias do gene 16S rRNA do domínio bacteriano total. Dentro de cada painel, diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

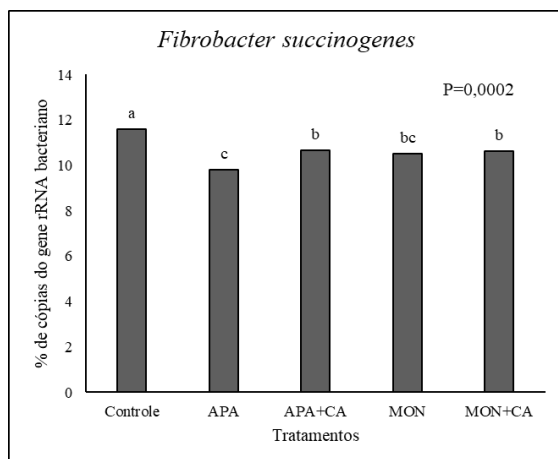


Figura 3A

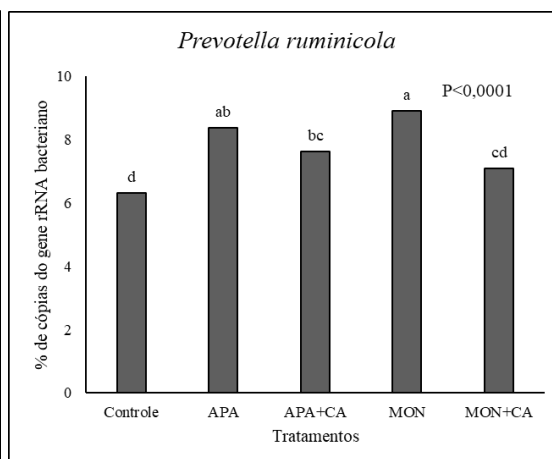


Figura 3B

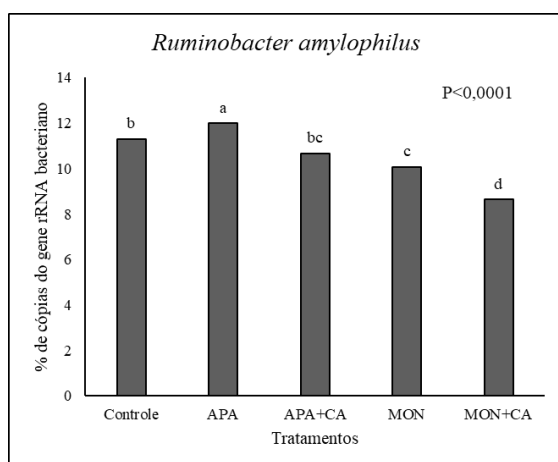


Figura 3C

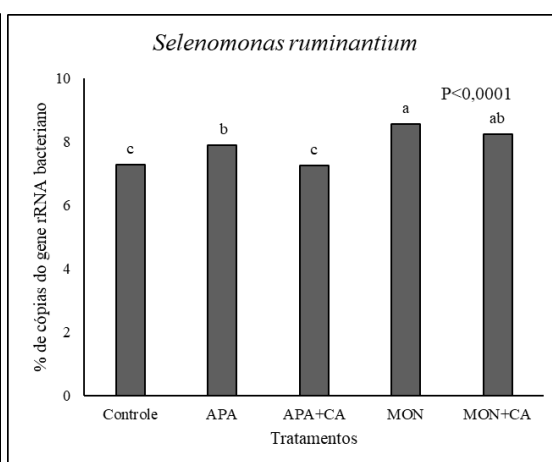


Figura 3D

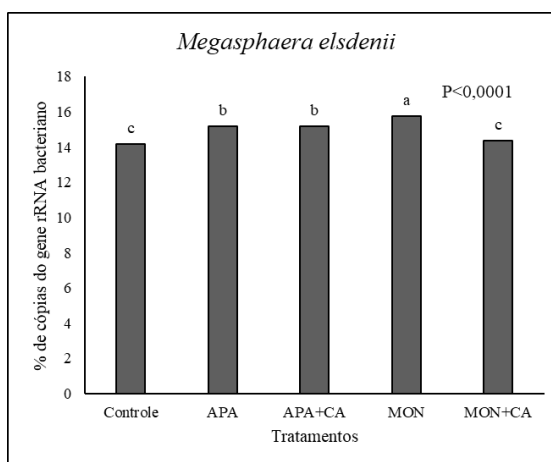


Figura 3E

Figura 3. Valores médios de abundância relativa de espécies bacterianas ruminais Gram-negativas em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON. As populações são expressas como porcentagens do número de cópias do gene 16S rRNA do domínio bacteriano total. Dentro de cada painel, diferentes letras minúsculas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Tabela 10. Principais efeitos dos aditivos (APA ou MON), associados ou não com o caroço de algodão, sobre a abundância relativa de bactérias ruminais e *Archaea* em vacas lactantes

Espécie	Dietas				
	APA	MON	CA	APA+CA	MON+CA
<i>Ruminococcus albus</i>	↓	↓			
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	↓			↑	
<i>Eubacterium ruminantium</i>			↑		
<i>Streptococcus bovis</i>	↓	↓			
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	↓	↓			
<i>Prevotella ruminicola</i>	↑	↑			↓
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	↑	↓			
<i>Selenomonas ruminantium</i>	↑	↑		↓	
<i>Megasphaera elsdenii</i>	↑	↑			↓
<i>Archaea</i>	↓	↓		↑	↓

↓: redução da abundância relativa; ↑: aumento da abundância relativa.

A espécie *P. ruminicola* apresentou correlação positiva de intensidade média (Tabela 11) com a espécie *S. ruminantium* (48,46%) e de intensidade alta com *M. elsdenii* (73,33%). Entretanto, apresentou correlação negativa de intensidade média *R. albus* (-55,46%), *B. fibrisolvens* (-60,38%), *E. ruminantium* (-54,00%), *F. succinogenes* (-57,08%), *Archaea* (-44,15%) e de intensidade alta com *S. bovis* (-70,00%). *S. ruminantium* apresentou também correlação negativa de intensidade alta com *Archaea* (-85,15%).

E. ruminantium apresentou correlação positiva de intensidade média com a espécie *B. fibrisolvens* (59,23%) e negativa de intensidade média com *R. amylophilus* (-57,85%), que por sua vez, apresentou correlação negativa de intensidade média com *S. ruminantium* (-55,54%) e positiva de intensidade média com *Archaea* (65,92%). Já a espécie *S. bovis* apresentou correlação positiva de intensidade alta com *R. albus* (79,38%) e negativa de intensidade alta com *M. elsdenii* (-78,31%). Do mesmo modo, *M. elsdenii* apresentou correlação negativa de intensidade alta com *R. albus* (-79,46%) e de intensidade média com *F. succinogenes* (-44,31%) (Tabela 11).

O gênero *Dasytricha* (protozoário) apresentou correlação positiva de intensidade média com a espécie bacteriana *E. ruminantium* (49,73%) e negativa de intensidade média com *P. ruminicola* (-54,19%) (Tabela 12). Já o gênero *Entodinium* apresentou correlações positivas de intensidade média com as espécies *R. amylophilus* (48,85%) e *Archaea* (56,69%) e negativa de intensidade média com *E. ruminantium* (-42,54%). O gênero *Eodinium* apresentou correlações negativas de intensidade média com *F. succinogenes* (-42,54%), *R. amylophilus* (-48,77%) e *Archaea* (-66,38%), e positiva de intensidade média com *S. ruminantium* (44,77%). *Eremoplastron* apresentou correlações positivas de intensidade média com *R. albus* (41,42%) e *S. bovis* (48,34%), e negativa de intensidade média com *P. ruminicola* (-49,35%) e *M. elsdenii* (-41,88%). O gênero *Diplodinium* apresentou correlação positiva de intensidade média apenas com *B. fibrisolvens* (50,09%) (Tabela 12).

Tabela 11. Coeficientes de correlação de Spearman entre espécies de bactérias ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Espécie	<i>E.</i> <i>ruminantium</i>	<i>S.</i> <i>Bovis</i>	<i>P.</i> <i>Ruminicola</i>	<i>S.</i> <i>ruminantium</i>	<i>M.</i> <i>elsdenii</i>	<i>Archaea</i>
<i>R. albus</i>		0,7938*	-0,5546***		-0,7946*	
<i>B. fibrisolvens</i>	0,5923***		-0,6038***			
<i>E. ruminantium</i>			-0,5400***			
<i>S. bovis</i>			-0,7000*			
<i>F. succinogenes</i>			-0,5708***		-0,4431****	
<i>R. amylophilus</i>	-0,5785***			-0,5554***		0,6592**
<i>S. ruminantium</i>			0,4846****			
<i>M. elsdenii</i>		-0,7831*	0,7333*			
<i>Archaea</i>			-0,4415****	-0,8515*		

Significativo * (P<0,0001); ** (P<0,001); *** (P<0,01); **** (P<0,05).

Tabela 12. Coeficientes de correlação de Spearman entre os gêneros de protozoários ciliados e bactérias ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Gêneros	<i>Dasytricha</i>	<i>Entodinium</i>	<i>Diplodinium</i>	<i>Eodinium</i>	<i>Eremoplastron</i>
<i>R. albus</i>					0,4142***
<i>B. fibrisolvens</i>			0,5009***		
<i>E. ruminantium</i>	0,4973***	-0,4254***			
<i>S. bovis</i>					0,4834***
<i>F. succinogenes</i>				-0,4254***	
<i>P. ruminicola</i>	-0,5419**				-0,4935***
<i>R. amylophilus</i>		0,4885***		-0,4877***	
<i>S. ruminantium</i>				0,4477***	
<i>M. elsdenii</i>					-0,4188***
<i>Archaea</i>		0,5669**		-0,6638*	

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

No geral o APA afetou a população bacteriana de forma similar à monensina, reduzindo a maioria das espécies de bactérias Gram-positivas, como *R. albus* e *S. bovis* e favorecendo o crescimento de bactérias Gram-negativas, como *P. ruminicola*, *S. ruminantium* e *M. elsdenii*, com exceção de *F. succinogenes*, que reduziu com APA e MON. Em contrapartida, APA e MON agiram de forma diferente sobre as espécies *B. fibrisolvans* (Gram-negativa, mas estruturalmente Gram-positiva, sem membrana externa trilamelar) e *R. amylophilus* (Gram-negativa, realiza degradação de amido no espaço periplasmático e sódio é requerido para máximo crescimento e mantém concentração intracelular ótima de Na^+ de 0,2 mM por meio de um antitransportador $\text{Na}^+/\text{2H}^+$, produz formato, acetato e succinato), em que APA reduziu o crescimento da primeira e favoreceu a segunda, ao contrário de MON. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que a sensibilidade à monensina pode ser determinada por efeitos variáveis em função da constituição e da espessura da parede celular e não por uma diferença clara entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Schären et al., 2017). Adicionalmente, isto é consistente com as diferenças nos modos de ação destes ionóforos sobre canais iônicos de membrana citoplasmática.

Os ionóforos são mais eficazes contra as bactérias Gram-positivas, cuja célula está rodeada pela camada de peptidoglicano, que é porosa e permite a passagem de moléculas pequenas atingindo a membrana citoplasmática, onde o ionóforo lipofílico se dissolve rapidamente na membrana. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas estão separadas do ambiente e dos agentes antimicrobianos por uma camada de lipopolissacarídeo, uma membrana externa e um espaço periplasmático (Paracini et al., 2022).

O mecanismo de ação da monensina como antibacteriano é conhecido e se dá por meio da capacidade do ionóforo em complexar com o cátion Na^+ e transportá-lo através da membrana citoplasmática, alterando a concentração iônica intracelular (Łowicki e Huczyński, 2013). Esse efeito é majoritariamente visualizado em bactérias Gram-positivas. Adicionalmente, Schären et al. (2017) reportaram que a sensibilidade à monensina pode ser determinada por efeitos variáveis em função da constituição e da espessura da parede celular e não por uma diferença clara entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.

Por outro lado, as moléculas de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA), cuja propriedade anfetérica pode ser aumentada no extrato aquoso ácido, uma vez que estas são ionizadas (Pereira et al., 2017), é capaz de promover um efeito desorganizador nos

transportadores de cálcio da membrana celular, impedindo o transporte de Ca^{2+} , resultando em morte celular (Choudhary et al., 2005; Domínguez et al., 2015).

Adicionalmente, o mecanismo de ação do APA foi descrito inicialmente em células eucarióticas por Choudhary et al. (2005), que mostraram a ação de bloqueio do canal de Ca^{2+} , e essa ação pode se estender a organismos procarióticos, já que oito transportadores de Ca^{2+} foram caracterizados filogeneticamente na membrana bacteriana com potencial eletroquímico, denominados proteínas de ligação ao Ca^{2+} (CaBPs). Essas características estruturais das CaBPs procarióticas sugerem que essas proteínas podem funcionar como tampões, sensores, transdutores de sinal ou desempenhar funções estruturais e/ou regulatórias. A ligação de alcaloides piperidínicos a essas CaBPs de membrana poderia afetar o transporte e o armazenamento de Ca^{2+} na célula bacteriana, reduzindo sua sobrevivência (Domínguez et al., 2015). A ação de bloqueio do transporte de cálcio pode afetar tanto as bactérias quanto as *Archaea* metanogênicas (Choudhary, et al., 2005; Domínguez et al., 2015; Efimova et al., 2020).

APA e MON nas dietas diminuíram a porcentagem de abundância relativa (%AbR) das espécies bacterianas celulolíticas *R. albus* e *F. succinogenes*, e não diferiram para *B. fibrisolvens*, com exceção da dieta APA sem CA, que apresentou redução de *B. fibrisolvens*. Apesar de acreditar que bactérias Gram-negativas (*F. succinogenes*, por exemplo) sejam mais resistentes aos efeitos dos aditivos do que bactérias Gram-positivas (*B. fibrisolvens*, por exemplo), por conta da presença de uma membrana externa protetora que envolve a parede celular (Burt, 2004; Marques e Cook, 2021), o presente estudo mostrou divergências. No entanto, os resultados estão de acordo com Khorrami et al. (2015) e Shen et al. (2017), que relataram maior susceptibilidade das bactérias celulolíticas ao efeito adverso da monensina, principalmente *R. albus* e *F. succinogenes*. Nas dietas com CA, foi observada uma certa resistência da bactéria *F. succinogenes*, quando comparada com as dietas suplementadas sem CA. Wang et al. (2021) relataram que *F. succinogenes* é resistente ao gossipol e, possivelmente, o maior conteúdo de lipídeos no CA pode ter atenuado a ação de APA e MON contra a célula microbiana por meio de interação entre moléculas lipofílicas com CA no presente estudo.

A espécie *B. fibrisolvens* é a principal produtora de butirato no rúmen (Russell e Strobel, 1989), onde butirato conta por aproximadamente 16% dos AGCC presentes (Stewart et al., 1997). Apesar de ter apresentado redução da população de *B. fibrisolvens*, a dieta APA apresentou o maior somatório de AGCC produzidos no rúmen

(51,74 mmol/L) devido principalmente a acetato e possivelmente, à compensação na produção de butirato pela *M. elsdenii*, cuja abundância relativa aumentou com APA. Marounek e Dušková (1999) relataram que *B. fibrisolvens* e *P. ruminicola* produziram mais acetato e menos butirato, lactato, succinato e H₂ quando cresceram no meio rico em pectina em comparação com meio rico em arabinose e glicose. Contudo, *P. ruminicola* liberou menos H₂ do que *B. fibrisolvens* em quaisquer substratos.

A espécie *E. ruminantium*, bactéria Gram-positiva, hemicelulolítica com atividade de xilanase, produz butirato, acetato e formato e apresentou aumento significativo em dietas contendo CA. Uma maior concentração de *E. ruminantium* está relacionada com aumento da eficiência alimentar, melhor degradação da fibra e melhor digestibilidade da ração (Elolimy et al., 2018; Halfen et al., 2020), o que possivelmente ocorreu no presente estudo, por conta da presença do CA, que forneceu proteínas e fibras degradáveis. Esta espécie requer ácidos graxos de cadeia ramificada e N-NH₃ é essencial para seu crescimento, apresentando alta atividade de desaminação de aminoácidos (Stewart et al., 1997).

Assim como *B. fibrisolvens*, as espécies *S. bovis* (Gram-positiva) e *S. ruminantium* (Gram-negativas) produzem amilase e apresentam o lactato como um dos produtos da fermentação, no entanto, são bactérias amilolíticas (Stewart et al., 1997). Quando a dieta é rica em concentrado (carboidratos não fibrosos), a espécie *S. bovis* cresce rapidamente e produz lactato em excesso, o que classifica essa bactéria como um dos principais agentes causadores da acidose ruminal (Jans et al., 2015; Park et al., 2021). Entretanto, a espécie *S. bovis* tem demonstrado ser sensível à monensina (Wampler et al., 1998), assim como os resultados do presente estudo também demonstraram sensibilidade ao APA.

Já a *S. ruminantium* é uma importante espécie bacteriana que utiliza uma diversidade de substratos e desempenha um importante papel na síntese de propionato, malato e lactato a partir do piruvato e succinato, produtos da fermentação primária (Shen et al., 2017; Wang et al., 2021). No presente estudo, as dietas contendo monensina (MON e MON+CA) e a dieta APA apresentaram aumento da população e estão de acordo com resultados encontrados na literatura (Schelling, 1984; Shen et al., 2017), que relataram aumento de *S. ruminantium* com a suplementação com monensina. Em contrapartida, foi observada redução da população de *S. ruminantium* na dieta APA+CA, o que pode ser parcialmente explicado pelo fato desta espécie ser sensível ao gossipol (Wang et al., 2021).

Apesar da redução da população de *S. ruminantium* na dieta APA+CA, a produção de propionato não foi afetada e refletiu em maior eficiência nas dietas com APA, demonstrado pela maior população de *M. elsdenii*, que produz propionato pela rota de fermentação do lactato por usar a via não-aleatória do acrilato (Russell e Wallace, 1997). Entre os organismos prevalentes em propiogênese no rúmen, *S. ruminantium* usa a via aleatória e *M. elsdenii* usa a via do acrilato (Russell e Wallace, 1997).

A redução da população de *R. amylophilus* nas dietas com monensina (MON sem CA e MON+CA) divergem dos resultados relatados na literatura (Marques e Cooke, 2021). No entanto, Narvaez et al. (2013) descreveram que a resposta de algumas espécies Gram-negativas em detrimento das Gram-positivas, é dependente da dose utilizada de monensina. Além disso, o presente estudo mostrou uma correlação negativa de intensidade média entre *R. amylophilus* e as espécies *E. ruminantium* (-57,85%) e *S. ruminantium* (-55,54%), o que sugere que o aumento da população de *E. ruminantium* e *S. ruminantium* desfavorece o crescimento da população de *R. amylophilus* e vice-versa.

De todas as espécies de bactérias ruminais, a *P. ruminicola* é considerada a mais resiliente na presença da monensina (Trautmann et al., 2023) e os resultados do presente estudo sugeriram também resiliência de *P. ruminicola* para o APA. De acordo com Trautmann et al. (2023), essa resiliência se dá por conta da capacidade da *P. ruminicola* de neutralizar a dissipação do gradiente de Na^+ , através do aumento da atividade de um complexo proteico de membrana translocador de Na^+ que reduz fumarato a succinato, favorecendo a produção de propionato.

Assim como *E. ruminantium*, *P. ruminicola* é uma bactéria que apresenta atividade proteolítica proeminente e é capaz de causar hiperamônia (Bach et al., 2005; Trautmann et al., 2023). Desta forma, o aumento da população de *P. ruminicola* no rúmen é refletido no aumento da concentração de N-NH_3 no rúmen e algumas cepas podem fermentar xilana, pectina e amido em vez de celulose (Wang et al., 2021). No presente estudo, a %AbR de *P. ruminicola* foi capaz de consolidar seu nicho ecológico no ambiente ruminal, suplementado com APA ou MON, e foi capaz de utilizar pectina fornecida principalmente pela palma (Veras et al., 2002) para a biossíntese de acetato (Marounek e Dušková, 1999) (Tabela 6) e, provavelmente, de succinato, favorecendo a produção de propionato por hidrogenotróficos como *S. ruminantium* e *M. elsdenii*, como pode ser confirmado pela correlação positiva significativa observada entre as suas abundâncias no rúmen.

Em contrapartida, as dietas com CA apresentaram %AbR para *P. ruminicola* menores do que as dietas sem CA, mas superiores ao controle. Apesar do APA e MON favorecerem o crescimento de *P. ruminicola*, possivelmente, esta espécie também se mostrou sensível ao efeito do gossipol presente no CA, como mostrado por Wang et al. (2021).

A população de *M. elsdenii* foi maior nas dietas suplementadas, com exceção da dieta MON+CA, que não diferiu do controle. *M. elsdenii* é uma espécie que utiliza o lactato como substrato para produzir butirato, propionato e valerato (Stewart et al., 1997; Meissner et al., 2010). O aumento da população desta espécie pode evitar a acidose causada pelo acúmulo de lactato ruminal (Leeuw et al., 2016). No presente estudo, a concentração de lactato não foi influenciada pelas dietas e a produção de butirato na dieta APA possivelmente se manteve por conta do aumento da população de *M. elsdenii*, uma vez que *B. fibrisolvens*, uma das principais espécies produtoras de butirato no rúmen, diminuiu com APA. Vale salientar que o butirato apresenta benefícios ruminais, metabólicos e pode influenciar positivamente a produção de leite (Van Soest, 1994; Mentschel et al., 2001; Seymour et al., 2005).

De acordo com Soares et al. (2015) as bactérias que utilizam o ácido láctico como substrato para síntese de AGCC, como *M. elsdenii*, geralmente são mais resistentes aos efeitos dos aditivos, especialmente ionóforos. O relato dos autores está de acordo com o presente estudo, que além de resistência, foi observada adaptabilidade dessa espécie aos aditivos APA e MON.

Foi observado que as dietas suplementadas, com exceção do APA+CA, reduziram a %AbR de *Archaea* metanogênicas. Estudos anteriores têm demonstrado o baixo ou nenhum efeito direto da monensina contra *Archaea* metanogênicas, mas a diminuição de bactérias Gram-positivas reduz a concentração ruminal de substratos metanogênicos, o que pode desfavorecer a multiplicação de *Archaea* e/ou a metanogênese (Haney e Hoehn, 1967; Russell e Strobel, 1989; Russell e Houlihan, 2003; Söllinger et al., 2018). A esse respeito, Söllinger et al. (2018) relataram que, enquanto a abundância dos genes 16S rRNA das *Archaea* atingiu o pico 1 h após a alimentação, a abundância do mRNA da metanogênese não atingiu o pico até 3 h após a alimentação. Assim, apesar da abundância populacional de metanogênicos, a maior disponibilidade de substratos CO₂, H₂ e/ou formato, pode ter contribuído para aumentar a metanogênese, principalmente, porque a coleta do conteúdo ruminal ocorreu 4 h após alimentação.

Os resultados estão de acordo com McGarvey et al. (2019), que identificaram redução na população de *Archaea* metanogênicas em bovinos leiteiros em lactação recebendo diferentes doses de monensina. No entanto, Guan et al. (2006) e Hook et al. (2009) relataram que após 4 e 12 semanas, as bactérias tendem a se adaptar ao efeito da monensina. Ainda não se sabe o efeito do APA sobre os microrganismos ruminais em longo prazo, o que torna necessária novas pesquisas sobre o assunto.

A esse respeito, na ausência de CA, APA e MON reduziram a abundância relativa de metanogênicos, sendo que MON mostrou menor abundância relativa. MON associada ao CA reduziu ainda mais a população de metanogênicos. Que não foi afetada pela associação de APA com CA. Estes resultados são consistentes com a menor proporção de CH₄ relativa aos AGCC (Σ Ac + Pr + Bu; Σ Ac + Bu) presentes no fluido ruminal, observada na dieta MON com CA quando comparada com a dieta MON sem CA.

Assim, as reduções de metanogênicos/metanogênese observadas nas dietas suplementadas podem ser explicadas pela diminuição das populações de *R. albus* e *B. fibrisolvens* liberadoras de H₂, já que *R. albus* reduziu com MON e APA e *B. fibrisolvens* foi menos abundante na dieta com APA sem CA. Por outro lado, APA estimulou a população de *R. amylophilus*, produtora de formato, que é substrato para metanogênese, apesar desta espécie reduzir fumarato para produzir succinato (Stewart et al., 1997). Possivelmente, pelo fato de o CO₂ ser essencial para o crescimento de *R. amylophilus*, a maior concentração de CO₂ no conteúdo ruminal na dieta APA sem CA contribuiu para o aumento da sua abundância.

Observa-se que a monensina não é inibidora das *Archaea* metanogênicas (Marques e Cooke, 2021), acreditando-se que a menor produção do gás se deve à menor produção dos precursores H₂ e formato (McAllister et al., 2015; Thompson e Rowntree, 2020), provavelmente por inibir as bactérias fibrolíticas Gram-positivas, que produzem hidrogênio, e por favorecer bactérias Gram-negativas, como *F. succinogenes* e *S. ruminantium*. No entanto, a *F. succinogenes* é importante na digestão da fibra ruminal (Kobayashi et al., 2008), e esta etapa fundamental pode fornecer substratos a outras bactérias capazes de produzir H₂ ou compostos contendo metil.

Sawanon et al. (2011) sugeriram que algumas cepas de *S. ruminantium* estão envolvidas na digestão da fibra ruminal, cooperando com *F. succinogenes*, o que não foi evidenciado no presente estudo, possivelmente devido às ações de APA e MON contra *F. succinogenes*. *F. succinogenes* e *S. ruminantium*, entre outras, oxidam o H₂

utilizando o fumarato como aceptor final de elétrons, o que sugere que competem com as metanogênicas pelo H₂, que é o principal substrato para a metanogênese no rúmen (Greening et al., 2019). Além disso, o formato pode ser utilizado como outro doador de elétrons para a redução do fumarato (Kamke et al., 2016). Como a dieta APA + CA reduziu tanto a abundância relativa de *S. ruminantium* quanto de *F. succinogenes*, possivelmente contribuiu para aumentar a população de *Archaea* por maior disponibilização de substratos para metanogênese. Por outro lado, ao comparar as dietas sem CA contendo APA ou MON, verifica-se que, apesar de APA ter proporcionado maior abundância relativa de *Archaea*, promoveu a mesma intensidade de CH₄ relativa ao conteúdo de AGCC no rúmen. Mesmo assim APA foi tão eficaz quanto MON em reduzir substratos para metanogênese no rúmen, por modificar o padrão de fermentação como resultado da alteração da microbiota ruminal.

Assim, a limitação de substrato para a metanogênese hidrogenotrófica deve ser sempre causada pela falta do H₂ doador de elétrons. Uma estratégia que utilize inibidores da metanogênese para redirecionar os sequestros de [H] deve avaliar os possíveis efeitos diretos dos inibidores nos microrganismos ruminais não metanogênicos, de modo a evitar afetar processos como a digestão das fibras ou a produção de propionato. A quantidade de hidrogênio gerado no rúmen é diretamente influenciada pelo padrão de fermentação dos AGCC (Sawanon et al., 2011; Patra, 2016; Ungerfeld, 2020).

P. ruminicola foi a espécie que apresentou maior quantidade de correlações negativas com outras espécies bacterianas, sendo a maioria celulolíticas, e com *Archaea*. Além disso, tem sido relatado que vacas com alta eficiência alimentar abrigam uma microbiota ruminal com uma maior abundância relativa de *Bacteroidetes*, como *Prevotella*, e uma menor abundância relativa de *Firmicutes*, como *B. fibrisolvens* (Marounek e Dušková, 1999; Delgado et al., 2019). Este relato é consistente com o resultado das ações de APA e MON sobre estas espécies de bactérias.

Os resultados de correlações entre espécies bacterianas ruminais mostram maior resistência das bactérias proteolíticas e amilolíticas em detrimento das celulolíticas, uma vez que *P. ruminicola* apresentou correlação positiva de intensidade média com *S. ruminantium* e de intensidade alta com *M. elsdenii*. Tais resultados podem ser explicados pelo fato de que, no presente estudo, as dietas foram compostas por cerca de 60% de concentrado, o que favorece o aumento da população de bactérias amilolíticas e

proteolíticas, além do efeito inibidor dos aditivos e do gossipol, sobre algumas espécies celulolíticas Gram-positivas.

Os efeitos modulatórios do microbioma ruminal pelos aditivos podem ser confirmados pela análise de correlação entre as populações de bactérias avaliadas. Foi observada correlação negativa de intensidade alta entre *R. albus* e média entre *F. succinogenes*, bactérias celulolíticas, e *M. elsdenii* e, positiva de intensidade alta entre *R. albus* e *S. bovis*, que por sua vez, também apresentou correlação negativa de intensidade alta com *M. elsdenii*. Assim, as dietas suplementadas estimularam o aumento das populações de *M. elsdenii* e de *P. ruminicola* contribuindo com a redução das populações de bactérias celulolíticas. Além de *P. ruminicola*, as *Archaea* também apresentaram correlação negativa de intensidade alta com *S. ruminantium*, o que indica antagonismo entre essas espécies. No entanto, *Archaea* apresentou correlação positiva de intensidade média com *R. amylophilus*, uma espécie amilolítica, que possivelmente pode favorecer o crescimento populacional de *Archaea*, conforme discutido anteriormente.

Das espécies bacterianas estudadas no presente estudo e os gêneros de protozoários identificados, foram observadas correlações entre nove espécies de bactérias, mais *Archaea*, e cinco gêneros de protozoários. Dentre eles, o gênero *Entodinium*, identificado como o mais abundante no ambiente ruminal, apresentou correlação negativa de intensidade média com *E. ruminantium* e positiva de intensidade média com *R. amylophilus* e *Archaea*. As dietas com CA aumentaram a %AbR de *E. ruminantium* e diminuíram as de *R. amylophilus*. Em contrapartida, a dieta APA aumentou a %AbR de *R. amylophilus* e não influenciou *E. ruminantium* e, apesar de não apresentar diferença estatística, aumentou a população de *Entodinium* em 37,18% em comparação ao controle. De acordo com Andersen et al. (2023) a espécie *Entodinium* utiliza prioritariamente a celulose e hemicelulose como substratos primários, podendo utilizar o amido como substrato secundário e a abundância de sua população no rúmen é característica de animais com alta produção de metano, o que explica a correlação positiva com *Archaea* e a amilolítica *R. amylophilus*, e negativa com a *E. ruminantium*.

Este resultado é consistente com as evidências de que a espécie *E. ruminantium* pode estar envolvida em um possível papel na acetogênese hidrogenotrófica da comunidade microbiana ruminal competindo pelo H₂ com *Archaea* (Li et al., 2022). Em contrapartida, *R. amylophilus* pode favorecer *Archaea* por produzir formato e não malato. O malato é produzido por carboxilação de piruvato para formar oxaloacetato

sendo em seguida reduzido a malato (rota que utiliza CO₂ e H₂) (Stewart et al., 1997; Russell e Wallace, 1997).

Já o gênero *Eodinium*, segundo mais abundante no presente estudo, apresentou correlações negativas de intensidade média com *F. succinogenes*, *R. amylophilus* e *Archaea*, e positiva de intensidade média com *S. ruminantium*. A presença do gênero *Eodinium* é característico de dietas fibrosas e importante na degradação da celulose, assim como *S. ruminantium* e *F. succinogenes*. No entanto, diferentemente de outras bactérias celulolíticas, *F. succinogenes* não degrada celulose usando celulosoma ou produzindo altas quantidades de enzima celulase (extracelular) (Suen et al., 2011), o que possivelmente causa correlação negativa, juntamente com a amilolítica *R. amylophilus*, com o gênero de protozoário *Eodinium*. Além disso, as dietas APA e MON aumentaram a %AbR de *S. ruminantium* e reduziram a de *F. succinogenes*, o que possivelmente influenciou a correlação entre estas espécies e o gênero *Eodinium*. Da mesma forma, o gênero *Eremoplastron* apresentou correlação positiva de intensidade média com a celulolítica, *R. albus* e com a amilolítica *S. bovis*, e negativa de intensidade média com *P. ruminicola* e *M. elsdenii*.

Tanto o gênero *Eremoplastron* quanto a espécie *S. bovis* são encontrados majoritariamente em animais que se alimentam de dietas com alta quantidade de concentrado e são predominantes em caso de acidose ruminal (Granja-Salcedo et al., 2016), o que explica a correlação positiva entre eles. No presente estudo, o APA e a MON reduziram a população de *S. bovis* e aumentaram a de *P. ruminicola* e *M. elsdenii*. Vale salientar que o aumento da população de *M. elsdenii* é importante na prevenção da acidose ruminal, pela sua capacidade de utilizar o lactato como substrato (Cabral e Weimer, 2024), o que explica a correlação negativa com *Eremoplastron*.

Os resultados demonstraram correlações dependentes do substrato, uma vez que protozoários e bactérias preferencialmente amilolíticas e/ou proteolíticas apresentaram correlações positivas entre si e negativas entre espécies e gêneros preferencialmente celulolíticos, da mesma forma, foi identificado o contrário. Assim como também foi observado que arqueas se beneficiam prioritariamente pela ausência de bactérias e protozoários preferencialmente amilolíticos.

No ensaio enzimático utilizado para identificar e quantificar a atividade das enzimas Fpase (atividade de celulase em papel de filtro), CMCase (carboximetilcelulase), amilase, xilanase, pectinase e protease no conteúdo ruminal de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não CA, suplementadas com

APA ou MON, foi verificada redução da atividade de Fpase ($P=0,0026$) em animais que receberam a dieta contendo APA (Tabela 13). Em contrapartida, não houve diferença entre as atividades das enzimas Fpase e pectinase em animais que receberam as dietas controle, APA+CA, MON e MON+CA. Foi identificado aumento da atividade da amilase ($P<0,0001$) para as dietas MON+CA, APA+CA e MON, quando comparadas com a dieta controle, com destaque para MON+CA, que apresentou a maior média (1,7238 U/mL). Da mesma forma, a atividade da pectinase foi maior ($P<0,0001$) nas dietas MON, APA+CA, MON+CA e APA, quando comparadas com a controle. Já a atividade da protease foi maior ($P<0,0001$) nas dietas suplementadas, com destaque para as dietas com CA.

Tabela 13. Unidades por mL (U/mL) de enzimas ruminais de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Enzima	Dietas					EPM ¹	P-Value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
	Atividade Enzimática (U/mL)						
Fpase	0,0552 ^a	0,0338 ^b	0,0503 ^a	0,0446 ^{ab}	0,0537 ^a	0,0020	0,0026
CMCase	0,5071	0,5148	0,4752	0,5629	0,5309	0,0105	0,1493
Amilase	0,6855 ^c	0,4563 ^c	1,0328 ^b	1,1895 ^b	1,7238 ^a	0,0918	<0,001
Xilanase	1,1257	1,0631	1,1247	1,0944	1,0512	0,0135	0,4569
Pectinase	0,0430 ^c	0,1325 ^b	0,4483 ^a	0,4572 ^a	0,4455 ^a	0,0371	<0,001
Proteinase	1,34 ^c	3,53 ^c	4,61 ^b	1,93 ^d	5,03 ^a	0,2985	<0,001

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$); ¹Erro padrão da média.

Fpase e CMCase são enzimas envolvidas na degradação da celulose e compõem o complexo de celulasas. No entanto, CMCase é uma endoglicanase responsável por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero celulósico. Já a Fpase, além de endoglicanase, também atua como exoglicanase com estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (Gusakov et al., 2007; Soares et al., 2011). No presente estudo, foi observada influência dos aditivos apenas para Fpase, em que as dietas MON (0,0446 U/mL) e APA (0,0338 U/mL) apresentaram menores concentrações de unidades por mL (U/mL), o que pode ser explicado pela redução na %AbR de bactérias celulolíticas, especialmente *R. albus* e *F. succinogenes* o que implica na redução da atividade das celulasas.

Já para amilase, houve aumento da atividade nas dietas com CA, com destaque para MON+CA, e para dieta MON. Apesar de terem apresentado reduções na %AbR de

algumas das principais espécies de bactérias amilolíticas (*R. amylophilus* e *S. bovis*), a atividade da amilase se manteve eficiente nas dietas com CA e na dieta MON, possivelmente devido ao aumento da população de *S. ruminantium* e não alteração da população de *B. fibrisolvens* que são importantes na degradação do amido no meio extracelular. Por outro lado, a dieta APA sem CA promoveu queda da atividade de amilase extracelular por ter inibido a população de *B. fibrisolvens*, ao mesmo tempo em que, estimulou *R. amylophilus*, que degrada amido não envolvendo amilases extracelulares (Anderson, 1995).

As atividades de pectinase e proteinase também foram maiores nas dietas suplementadas, com destaque para as dietas com CA. A produção de pectinases são características de bactérias como *P. ruminicola* (Gradel e Dehority, 1972), que apresentou aumento da %AbR nas dietas aditivadas e com CA, e *B. fibrisolvens* (Gradel e Dehority, 1972), que manteve a %AbR entre as dietas aditivadas com CA. O aumento da atividade pectinolítica de ambas as espécies está relacionado também com o aumento na concentração de acetato (Marounek e Dušková, 1999; Liu et al., 2015).

Já a atividade proteolítica é identificada em diversos gêneros de protozoários (como *Entodinium*, *Polyplastron*, *Isotricha* e *Dasytricha*) e bactérias (como *E. ruminantium*, *Ruminobacter amylophilus*, *P. ruminicola*, *B. fibrisolvens*, *M. elsdenii* e *S. bovis*) (Wallace, 1996; Wallace et al., 1997). Destas espécies, a que possui alta atividade de produção de amônia (hiperamônia) é *E. ruminantium*, consistentemente, o CA estimulou o seu crescimento e assim maior atividade de proteinases no conteúdo ruminal. No geral, possivelmente, a abundância do gênero *Entodinium* juntamente com o aumento das populações de *P. ruminicola*, *S. ruminantium* e *M. elsdenii* nas dietas suplementadas, aumentaram a concentração e atividade das proteinases.

4 – CONCLUSÕES

O extrato alcaloídico de algaroba (APA) na dose de 8 mg/kg de MS não afeta as funções renal e hepática de vacas lactantes. Dietas com APA ou monensina (MON) sem caroço de algodão (CA) reduzem colesterol total sem afetar a concentração sérica de glicose e de BHB. O CA aumenta o nível de AGNE no sangue, reduz BHB devido a um possível aumento da síntese hepática de colesterol.

APA assemelha-se à MON quanto à alteração do microbioma core do rúmen, decrescendo sua diversidade por afetar *S. bovis* e as populações de bactérias fibrolíticas, *R. albus* e *F. succinogenes*, e aumentar as populações de bactérias amilolíticas, *P. ruminicola*, *S. ruminantium* e *M. elsdenii*. No entanto, diferentemente de MON, APA inibe *B. fibrisolvens* e estimula *R. amylophilus*, o que pode afetar a atividade de amilase extracelular do fluido ruminal.

MON e APA reduzem a atividade de celulase do fluido ruminal, medida em fibra celulósica de papel de filtro como substrato.

APA e MON aumentam a concentração de acetato no fluido ruminal por estimular o crescimento de *P. ruminicola* em dieta composta por palma forrageira, que é rica em pectina, consistente com aumento em atividade de pectinase.

MON associada com CA foi mais eficaz na redução da população de *Archaea* e na redução da quantidade de metano relativa aos AGCC presentes no conteúdo ruminal, por reduzir população de *R. amylophilus*.

APA sem CA aumenta a concentração de AGCC sem alterar a intensidade de metano no fluido ruminal mesmo com redução de *Archaea*, por aumentar a população de *R. amylophilus*, que se correlaciona de forma moderada positiva com metanogênicos por sintrofia.

APA associado ao CA não afeta a abundância de *B. fibrisolvens*, estimula *R. amylophilus* e inibe *S. ruminantium* com conseqüente aumento da abundância de *Archaea* metanogênicas.

APA tende aumentar a concentração de propionato no fluido ruminal por aumentar a população de *M. elsdenii*.

O CA aumenta a atividade de proteinases no rúmen por estimular a abundância de *E. ruminantium*. Há correlação negativa entre *E. ruminantium* e *R. amylophilus*.

S. ruminantium apresenta divergência sintrófica moderada com *R. amylophilus* e elevada com *Archaea* por promover sequestro de hidrogênio no rúmen.

O aparecimento de protozoários celulolíticos no rúmen como *Metadinium* são favorecidos por APA, assim como MON favorece o aparecimento do gênero *Polyplastron*.

Entodinium, gênero mais abundante no rúmen, apresenta correlação positiva com *R. amylophilus* e com *Archaea* e negativa com *E. ruminantium*.

Eodinium, segundo gênero mais abundante, apresenta correlação positiva com *S. ruminantium* e negativa com *Archaea*.

A dieta contendo APA sem caroço apresentou melhores resultados sobre os metabólitos sanguíneos e parâmetros ruminais em vacas lactantes.

APA e MON, associados ou não ao CA, apresentam efeitos semelhantes sobre os metabólitos sanguíneos, parâmetros ruminais e composição microbiana do rúmen, sendo APA um produto natural seguro apresentando alternativa aos antibióticos e promotores de crescimento.

5 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, T.O.; ALTSHULER, I.; LEÓN, A.V.-P.; WALTER, J.M.; MCGOVERN, E.; KEOGH, K.; MARTIN, C.; BERNARD, L.; MORGAVI, D.P.; PARK, T.; LI, Z.; JIANG, Y.; FIRKINS, J.L.; YU, Z.; HVIDSTEN, T.R.; WATERS, S.M.; POPOVA, M.; ARNTZEN, M.Ø.; HAGEN, L.H.; PAPA, P.B. metabolic influence of core ciliates within the rumen microbiome. **The ISME Journal**, v.17, p.1128-1140, 2023.

ANDERSON, K.L. Biochemical analysis of starch degradation by *Ruminobacter amylophilus* 70. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1488-1491, 1995.

ASCHENBACH, J.R.; PENNER, G.B.; STUMPF, F.; GÄBEL, G. Ruminant Nutrition Symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science**, v.89, p.1092–1107, 2011.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.E9–E21, 2005.

BACH, A.; ELCOSO, G.; ESCARTÍN, M.; SPENGLER, K.; JOUVE, A. Modulation of milking performance, methane emissions, and rumen microbiome on dairy cows by dietary supplementation of a blend of essential oils. **Animal**, v.17, 100825, 2023.

BERGMAN, E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, v.70, p.567-590, 1990.

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

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

BUTLER, W.R. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.2533-2539, 1998.

CABRAL, L.S.; WEIMER, P.J. *Megasphaera elsdenii*: Its Role in Ruminant Nutrition and Its Potential Industrial Application for Organic Acid Biosynthesis. **Microorganisms**, v.12, 219, 2024.

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

CASTILLO-LOPEZ, E.; DOMPINGUEZ-ORDÓÑEZ, M.G. Factors affecting the ruminal microbial composition and methods to determine microbial protein yield. Review. **Revista Mexicana de Ciências Pecuárias**, v.10, p.120-148, 2019.

CHENG, Z.; MENG, Z.; TAN, D.; DATSOMOR, O.; ZHAN, K.; LIN, M.; ZHAO, G. Effects of supplementation of sodium acetate on rumen fermentation and microbiota in postpartum dairy cows. **Frontiers in Microbiology**, v.13, 1053503, 2022.

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

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

COPPO, J.A.; MUSSART, N.B.; REVIDATTI, M.A.; CAPELLARI, A. Absence of biochemically demonstrable stress in early weaned half-bred zebu calves. **International Journal of Agriculture and Natural Resources**, v.30, p.97-105, 2003.

COSTA, D.S. **Níveis de extrato Alcalóidico de algaroba como aditivo alimentar em dietas de vacas lactantes**. 2022. 91p. Tese (doutorado em Zootecnia). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.725-729, 1999.

DAYANI, O.; GHORBANI, G.R.; ALIKHANI, M.; RAHMANI, H.R.; MIR, P.S. Effects of dietary whole cottonseed and crude protein level on rumen protozoal population and fermentation parameters. **Small Ruminant Research**, v.69, p.36-45, 2007.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied in Environmental Microbiology**, v.48, p.182-185, 1984.

DEHORITY, B.A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa**. Florida: CRC Press Inc., 1993. 96p.

DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology**. Nottingham: Nottingham University Press, 2nd ed. 2004. 372p.

DEHORITY, B.A. Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v.52, p.339-342, 2005.

DELGADO, B.; BACH, A.; GUASCH, I.; GONZÁLEZ, C.; ELCOSO, G.; PRYCE, J.E.; GONZALEZ-RECIO, O. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. **Scientific Reports**, v.9, 11, 2019.

DENMAN, S.E.; MCSWEENEY, C.S. Quantitative (Real-Time) PCR. In: MAKKAR, H.P.S.; MCSWEENEY, C.S. (Ed.). **Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants**. Netherlands: Springer, p.105-115, 2005.

DILS, R.R. Comparative aspects of milk fat synthesis. **Journal of Dairy Science**, v.69, p.904-910, 1986.

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

DUARTE, E.R.; ABRÃO, F.O.; RIBEIRO, I.C.O.; VIEIRA, E.A.; NIGRI, A.C.; SILVA, K.L.; VIRGÍNIO JUNIOR, G.F.; BARRETO, S.M.P.; GERASEEV, L.C. Rumen protozoa of different ages of beef cattle raised in tropical pastures during the dry season. **Journal of Applied Animal Research**, v.46, p.1457-1461, 2018.

DUFFIELD, T.F.; MERRIL, 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.

EFIMOVA, S.S.; ZAKHAROVA, A.A.; OSTROUMOVA, O.S. Alkaloids Modulate the Functioning of Ion Channels Produced by Antimicrobial Agents via an Influence on the Lipid Host. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.8, 537, 2020.

ELOLIMY, A. A.; ARROYO, J. M.; BATISTEL, F.; IAKIVIAK, M.A.; LOOR, J.J. Association of residual feed intake with abundance of ruminal bacteria and biopolymer hydrolyzing enzyme activities during the peripartur period and early lactation in Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.9, 43, 2018.

ELMHADI, M.E.; ALI, D.K.; KHOGALI, M.K.; WANG, H. Subacute ruminal acidosis in Dairy herds: Microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. **Animal Nutrition**, v.10, p.148-155, 2022.

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**, v.127, p.2-11, 2019.

FENNER, H. Method for determining total volatile bases in rumen fluid by steam distillation. **Journal of Dairy Science**, v.48, p.249-251, 1965.

FREGULIA, P.; CAMPOS, M.M.; DIAS, R.J.P.; LIU, J.; GUO, W.; PEREIRA, L.G.R.; MACHADO, M.A.; FAZA, D.R.L.R.; GUAN, L.L.; GARNSWORTHY, P.C.; NEVES, A.L.A. Taxonomic and predicted functional signatures reveal linkages between the rumen microbiota and feed efficiency in dairy cattle raised in tropical areas. **Frontiers in Microbiology**, v.13, 1025173, 2022.

FREGULIA, P.; NEVES, A.L.A.; DIAS, R.J.P.; CAMPOS, M.M. A review of rumen parameters in bovines with divergent feed efficiencies: what do these parameters tell us about improving animal productivity and sustainability? **Livestock Science**, v.254, 104761, 2021.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, v.59, p.257-268, 1987.

GOMES, R.S.; OLIVEIRA, T.S.; PEREIRA, J.C.; VIEIRA, R.A.M.; HENRIQUE, D.S.; FERNANDES, A.M.; LEONEL, F.P. Performance and metabolite profile of Dairy cows fed tropical grasses and concentrates containing crude protein with low or high degradability. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.45, p.572-580, 2016.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.

GONZÁLEZ, F.H.D. **Doze leituras em bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018. 159 p.

GOZHO, G.N.; KRAUSE, D.O.; PLAIZIER, J.C. Ruminant Lipopolysaccharide Concentration and Inflammatory Response During Grain-Induced Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.856-866, 2007.

GRADEL, C.M.; DEHORITY, B.A. Fermentation of isolated pectin and pectin from intact forages by pure cultures of rumen bacteria. **Applied Microbiology**, v.23, p.332-340, 1972.

GRANJA-SALCEDO, Y.T.; RIBEIRO JÚNIOR, C.S.; JESUS, R.B.; GOMEZ-INSUASTI, A.S.; RIVERA, A.R.; MESSANA, J.D.; CANESIN, R.C.; BERCHIELLI, T.T. Effect of 80% concentrate levels on ruminal microorganisms and rumen fermentation in Nellore steers. **Archives of Animal Nutrition**, v.70, p.17-32, 2016.

GREENING, C.; GEIER, R.; WANG, C.; WOODS, L.C.; MORALES, S.E.; MCDONALD, M.J.; RUSHTON-GREEN, R.; MORGAN, X.C.; KOIKE, S.; LEAHY, S.C.; KELLY, W.J.; CANN, I.; ATTWOOD, G.T.; COOK, G.M.; MACKIE, R.I. Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants. **The ISME Journal**, v.13, p.2617-2632, 2019.

GUAN, H.; WITTENBERG, K.M.; OMINSKI, K.H.; KRAUSE, D.O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v.84, p.1896-1906, 2006.

GUSAKOV, A.V.; SALANOVICH, T.N.; ANTONOV, A.I.; USTINOV, B.B.; OKUNEV, O.N.; BURLINGAME, R.; EMALFARB, M.; BAEZ, M.; SINITSYN, A.P. Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.97, p.1028-1038, 2007.

HALFEN, J.; CARPINELLI, N.; DEL PINO, F.A.B.; CHAPMAN, J.D.; SHARMAN, E.D.; ANDERSON, J.L.; OSORIO, J.S. Effects of yeast culture supplementation on lactation performance and rumen fermentation profile and microbial abundance in mid-lactation Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.104, p.11580-11592, 2020.

HANEY, M.E.; HOEHN, M.M. Monensin, a New Biologically Active Compound. I. Discovery and Isolation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.7, p.349-351, 1967.

HOOK, S.E.; STEELE, M.A.; NORTHWOOD, K.S.; WRIGHT, A-D.G.; MCBRIDE, B.W. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. **Microbial Ecology**, v.62, p.94-105, 2011.

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

HRISTOV, A.N.; OH, J.; FIRKINS, J.L.; DIJKSTRA, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; MAKKAR, H.P.; ADESOGAN, A.T.; YANG, W.; LEE, C.; GERBER, P.J.; HENDERSON, B.; TRICARICO, J.M. Special topics—mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v.91, p.5045–5069, 2013.

HRISTOV, A.N.; OH, J.; LEE, C.; MEINEN, R.; MONTES, F.; OTT, T.; FIRKINS, J.; ROTZ, A.; DELL, C.; ADESOGAN, A.; YANG, W.; TRICARICO, J.; KEBREAB, E.; WAGHORN, G.; DIJKSTRA, J.; OOSTING, S. **Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production – a review of technical options for non-CO₂ emissions**. In: GERBER, P.J.; HENDERSON, B.; MAKKAR, H.P.S. (Eds.), FAO Animal Production and Health Paper No. 177, FAO, Rome, Italy (2013). Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i3288e/i3288e.pdf>>. Acesso em: 24 de abr. 2024.

HUUKI, H.; TAPIO, M.; MÄNTYSAARI, P.; NEGUSSIE, E.; AHVENJÄRVI, S.; VILKKI, J.; VANHATALO, A.; TAPIO, I. Long-term effects of early-life rumen microbiota modulation on dairy cow production performance and methane emissions. **Frontiers in Microbiology**, v.13, 983823, 2022.

INPI – Instituto Nacional Da Propriedade Industrial. PEREIRA, M.L.A.; BATISTA, R. **Aditivo à base de extrato vegetal em rações, utilizado como modificador da fermentação ruminal para melhoria do desempenho animal e mitigação da emissão de gases entéricos de efeito estufa**. BR 10 2012 030155-5, 27, 2014.

IZUMI, K.; FUKUMORI, R.; OIKAWA, S.; OBA, M. *Short communication*: Effects of butyrate supplementation on the productivity of lactating dairy cows fed diets differing in starch content. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.11051-11056, 2019.

JANS, C.; MEILE, L.; LACROIX, C.; STEVENS, M.J. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). **Infection, Genetics and Evolution**, v.33, p.419-436, 2015.

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

JOUANY, J.P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **The Journal of Nutrition**, v.126, p.1335-1346, 1996.

KAMKE, J.; KITTELMANN, S.; SONI, P.; LI, Y.; TAVENDALE, M.; GANESH, S.; JANSSEN, P.H.; SHI, W.; FROULA, J.; RUBIN, E.M.; ATTWOOD, G.T. Rumen metagenome and metatranscriptome analyses of low methane yield sheep reveals a *Sharpea*-enriched microbiome 81nutrientes8181d by lactic acid formation and 81nutrientes81. **Microbiome**, v.4, 56, 2016.

KHAFIPOUR, E.; LI, S.; PLAIZIER, J.C.; KRAUSE, D.O. Rumen Microbiome Composition Determined Using Two Nutritional Models of Subacute Ruminal Acidosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.7115-7124, 2009.

KHORRAMI, B.; VAKILI, A.R.; MESGARAN, M.D.; KLEVENHUSEN, F. Thyme and cinnamon essential oils: Potential alternatives for monensin as a rumen modifier in beef production systems. **Animal Feed Science and Technology**, v.200, p.8-16, 2015.

KITTELMANN, S.; DEVENTE, S.R.; KIRK, M.R.; SEEDORF, H.; DEHORITY, B.A.; JANSSEN, P.H. Phylogeny of the intestinal ciliates including *Charonina ventriculi*, and comparison of microscopy and 18S rRNA gene pyrosequencing for rumen ciliate community structure analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p.2433–2444, 2015.

KOBAYASHI, Y.; SHINKAI, T.; KOIKE, S. Ecological and physiological characterization shows that *Fibrobacter succinogenes* is important in rumen fiber digestion – review. **Folia Microbiologica**, v.53, p.195-200, 2008.

KOZA, G.A.; GIMÉNEZ, L.; ROCHINOTTI, D.; COPPO, J.A.; MUSSART, N.B. Effects of different levels of cottonseed consumption on the ruminal variables of half-bred zebu steers. **Revista Veterinaria**, v.26, p.3-12, 2015.

LEEuw, K.-J.; MEISSNER, H.H.; HENNING, P.H.; SIEBRITS, F.K.; APAJALAHTI, J.H.A.; KETTUNEN, A. Effects of virginiamycin and monensin administered alone or together with *Megasphaera elsdenii* strain NCIMB 41125 on *in vitro* production of lactate and VFA and the effects of monensin and *M. elsdenii* strain NCIMB 41125 on health and performance of feedlot steers. **Livestock Science**, v.183, p.54-62, 2016.

LENG, R.A. Factors affecting the utilization of ‘poor-quality’ forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research Reviews**, v.3, p.277-303, 1990.

LI, Q.S.; WANG, R.; MA, Z.Y.; ZHANG, X.M.; JIAO, J.Z.; ZHANG, Z.G.; UNGERFELD, E.M.; YI, K.L.; ZHANG, B.Z.; LONG, L.; LONG, Y.; TAO, Y.; HUANG, T.; GREENING, C.; TAN, Z.L.; WANG, M. Dietary selection of metabolically distinct microorganisms drives hydrogen metabolism in ruminants. **The ISME Journal**, v.16, p.2535-2546, 2022.

LI, Y.; DING, H.; LIU, L.; SONG, Y.; DU, X.; FENG, S.; WANG, X.; LI, X.; WANG, Z.; LI, X.; LI, J.; WU, J.; LIU, G. Non-esterified Fatty Acid Induce Dairy Cow Hepatocytes Apoptosis via the Mitochondria-Mediated ROS-JNK/ERK Signaling Pathway. **Frontiers**, v.8, 245, 2020.

LI, Y.; DING, H.Y.; WANG, X.C.; FENG, S.B.; LI, X.B.; WANG, Z.; LIU, Q.W.; LI, X.W. An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.100, p.844-851, 2016.

LIU, J.; PU, Y.-Y.; XIE, Q.; WANG, J.-K.; LIU, J.-X. Pectin Induces an In Vitro Rumen Microbial Population Shift Attributed to the Pectinolytic *Treponema* Group. **Current Microbiology**, v.70, p.67-74, 2015.

LLOYD, D.; WILLIAMS, A.G.; AMANN, R.; HAYES, A.J.; DURRANT, L.; RALPHS, J.R. Intracellular prokaryotes in rumen ciliate protozoa: detection by confocal laser scanning microscopy after in situ hybridization with fluorescent 16S rRNA probes. **European Journal of Protistology**, v.32, p. 523-531, 1996.

ŁOWICKI, D.; HUCZYŃSKI, A. Structure and Antimicrobial Properties of Monensin A and Its Derivatives: Summary of the Achievements. **BioMed Research International**, v.2013, 742149, 2013.

MAROUNEK, M.; DUŠKOVÁ, D. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrovibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.429-433, 1999.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v.4, p.351–365, 2010.

MARQUES, R.S.; COOKE, R.F. Effects of Ionophores on Ruminal Function of Beed Cattle. **Animals**, v.11, 2871, 2021.

MCALLISTER, T.A.; MEALE, S.J.; VALLE, E.; GUAN, L.L.; ZHOU, M.; KELLY, W.J.; HENDERSON, G.; ATTWOOD, G.T.; JANSSEN, P.H. Ruminant Nutrition Symposium: Use of genomics and transcriptomics to identify strategies to lower ruminal methanogenesis. **Journal of animal Science**, v.93, p.1431-1439, 2015.

MCART, J.A.; NYDAM, D.V.; OETZEL, G.R.; OVERTON, T.R.; OSPINA, P.A. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. **Veterinary Journal**, v.198, p.560-570, 2013.

MCGARVEY, J. A.; PLACE, S.; PALUMBO, J.; HNASKO, R.; MITLOEHLER, F. Dosage-dependent effects of monensin on the rumen microbiota of lactating dairy cattle. **MicrobiologyOpen**, v.8, e00783, 2019.

MEISSNER, H.H.; HENNING, P.H.; HORN, C.H.; LEEUW, K.-J.; HAGG, F.M.; FOUCHÉ, G. Ruminal acidosis: a review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125. **South African Journal of Animal Science**, v. 40, p70-100, 2010.

MENTSCHER, J.; LEISER, R.; MÜLLING, C.; PFARRER, C.; CLAUS, R. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. **Archive of Animal Nutrition**, v.55, p.85-102, 2001.

MILLER, G.L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

NARVAEZ, N.; WANG, Y.; MCALLISTER, T. Effects of extracts of *Humulus lupulus* (hops) and *Yucca schidigera* applied alone or in combination with monensin on rumen fermentation and microbial populations in vitro. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.2517-2522, 2013.

NEWBOLD, C.J.; CHAMBERLAIN, D.G. Lipids as rumen defaunating agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.47, 154A, 1988.

NEWBOLD, C.J.; LASSALAS, B.; JOUANY, J.P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Letters of Applied Microbiology**, v.21, p.230-234, 1995.

NOGUEIRA, R.G.S.; PERNA JUNIOR, F.; PEREIRA, A.S.C.; CASSIANO, E.C.O.; CARVALHO, R.F.; RODRIGUES, P.H.M. Methane mitigation and ruminal fermentation changes in cows fed cottonseed and vitamin E. **Scientia Agricola**, v.77, e20180247, 2020.

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

OELKER, E R.; REVENEAU, C.; FIRKINS, J.L. Interaction of molasses and monensin in alfalfa hay- or corn silage-based diets on rumen fermentation, total tract digestibility, and milk production by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.270–285, 2009.

OHENE-ADJEI, S.; CHAVES, A.V.; MCALLISTER, T.A.; BENCHAAAR, C.; TEATHER, R.M.; FORSTER, R.J. Evidence of increased diversity of methanogenic archaea with plant extract supplementation. **Microbial Ecology**, v.56, p.234–242, 2008.

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

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

PARACINI, N.; SCHNECK, E.; IMBERTY, A.; MICCIULLA, S. Lipopolysaccharides at Solid and Liquid Interfaces: Models for Biophysical Studies of the Gram-negative Bacterial Outer Membrane. **Advances in Colloid and interface Science**, v.301, 102603, 2022.

PARK, S. Y.; LEE, M.; LIM, S.R.; KWON, H.; LEE, Y.S.; KIM, J.H.; SEO, S. Diversity and Antimicrobial Resistance in the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* Complex (SBSEC) Isolated from Korean Domestic Ruminants. **Microorganisms**, v.9, 98, 2021.

PARK, T.; MA, L.; MA, Y.; ZHOU, X.; BU, D.; YU, Z. Dietary energy sources and levels shift the multi-kingdom microbiota and functions in the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.11, 66, 2020.

PATRA, A.K. Recent Advances in Measurement and Dietary Mitigation of Enteric Methane Emissions in Ruminants. **Frontiers in Veterinary Science**, v.3, 39, 2016.

PATRA, A.K. A meta-analysis of the effect of dietary fat on enteric methane production, digestibility and rumen fermentation in sheep, and a comparison of these responses between cattle and sheep. **Livestock Science**, v.162, p.97-103, 2014.

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

PEREIRA, 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**, v.24, p.4301-4311, 2017.

POGLIANI, F.C.; BIRGEL JUNIOR, E. Reference values of the lipid profile of Holstein cattle bred in state of São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, p.373-383, 2007.

REIS, C.C.; MAEDA, E.M.; CEDROLA, F.; MARTINS, E.N.; DE PAULA, F.M.; MARTINELE, I. Diet and breed alter Community structures of rumen protozoa in cattle subjected to different feeding systems. **Semina: Ciências Agrárias**, v.40, p.909-918, 2019.

REISINGER, N.; WENDNER, D.; SCHAUERHUBER, N.; MAYER, E. Effect of Lipopolysaccharides (LPS) and Lipoteichoic Acid (LTA) on the Inflammatory Response in Ruminal Epithelial Cells (REC) and the Impact of LPS on Claw Explants. **Animals**, v.11, 2058, 2021.

RICHARDSON, L.F.; RAUN, A.P.; POTTER, E.L.; COOLEY, C.O.; RATHMACHER, R.P. Effect of monensin on rumen fermentation in vitro and in vivo. **Journal of Animal Science**, v.43, p.657-664, 1976.

RÍSPODI, T.B.; RODRIGUES, I.L.; MARTINS NETO, R.G.; KAZAMA, R.; PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; ARCURI, P.B. Ruminal ciliate protozoa of cattle and buffalo fed on diet supplemented with monensin or extracts from propolis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.92-97, 2009.

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

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

RUSSELL, J.B.; WALLACE, R.J. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. Blackie Academic and Professional, London, UK, pp.246-282.

SALVIO, G.M.M.; AGOSTO, M.D. Ciliates present in the stomach chambers of bovines. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.686-690, 2001.

SANTOS, A.C.R.; MAGALHÃES, D.Q.; AZEVEDO, R.A.; VIEIRA, I.L.N.L.; FRANÇA, D.E.G.; GERASEEV, L.C.; DUARTE, E.R. The effect of macaúba meal inclusion in the ruminal protozoa population of 85utri cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.1653-1659, 2015.

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

SANTOS, M.C.B.; ARAÚJO, A.P.C.; VENTURELLI, B.C.; FREITAS JR, J.E.; BARLETTA, R.V.; GANDRA, J.R.; PAIVA, P.G.; ACEDO, T.S.; RENNÓ, F.P. Effects of increasing monensin doses on performance of mid-lactating Holstein cows. **Journal of Applied Animal Research**, v.47, p.297-302, 2019.

SAWANON, S.; KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y. Evidence for the possible involvement of *Selenomonas ruminantium* in rumen fiber digestion. **FEMS Microbiology Letters**, v.325, p.170-179, 2011.

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

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

SEYMOUR, W.M.; CAMBELL, D.R.; JOHNSON, Z.B. Relationships between rumen volatile fatty acid concentrations and milk production in dairy cows: a literature study. **Animal Feed Science and Technology**, v.119, p.155-169, 2005.

SHEN, J.; LIU, Z.; YU, Z.; ZHU, W. Monensin and Nisin Affect Rumen Fermentation and Microbiota Differently In Vitro. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 1111, 2017.

SILVA, P.H.A.; SANTANA, T.M.; CARVALHO, G.B.; COUTINHO, B.B.; NASCIMENTO, E.C.L.; AMARAL, A.G.; ZAIDEN, R.T. Importância do uso de aditivos na nutrição de bovinos de corte. In: Semana do Curso de Zootecnia – SEZUS, 11., 2017, São Luís de Montes Belos, **Anais...São Luís de Montes Belos: SEZUS**, 2017.

SOARES, G.A.; ROCHA, T.J.O.; FERREIRA, A.N.; PACHECO, C.S.V. Quantificação da atividade de CMCase e Fpase produzidas a partir da fermentação em estado sólido da palma forrageira. **Revista Científica do Departamento de Química e Exatas**, v.2, p.22-29, 2011.

SOARES, M.S.; SILVA, L.G.; FRAZÃO, O.S.; SILVA, A.L.N. Food additives in ruminant nutrition. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.12, p.4162-4174, 2015.

SÖLLINGER, A.; TVEIT, A.T.; POULSEN, M.; NOEL, S.J.; BENGTTSSON, M.; BERNHARDT, J.; HELLWING, A.L.F.; LUND, P.; RIEDEL, K.; SCHLEPER, C.; HØJBERG, O.; URICH, T. Holistic Assessment of Rumen Microbiome Dynamics through Quantitative Metatranscriptomics Reveals Multifunctional Redundancy during Key Steps of Anaerobic Feed Degradation. **mSystems**, v.3, p.e00018-e00038, 2018.

SOUSA, L.B. **Extrato Alcalóidico de algaroba em dietas com níveis protéicos decrescentes para cordeiros**. 2019. 95p. Tese (doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Itapetinga.

SOUSA, L.B.; PEREIRA, M.L.A.; SILVA, H.G.O.; SOUSA, L.B.; E SILVA, L.S.; MACHADO, F.S.; TOMICH, T.R.; OSS, D.B.; FERREIRA, A.L.; CAMPOS, M.M.; COSTA, I.C.; PEREIRA, L.G.R. *Prosopis juliflora* piperidine alkaloid extract levels in diet for sheep change energy and nitrogen metabolism and affect enteric methane yield. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.102, p.5132-5140, 2022.

STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied in Microbiology Biotechnology**, v.75, p.165-174, 2007.

STEVENSON, D.M.; WEIMER, P.J. Dominance of *Prevotella* and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. **Applied in Microbiology Biotechnology**, ERRATUM, v.83, p.987-988, 2009.

STEWART, C.S.; FLINT, H.J.; BRYANT, M.P. The rumen bacteria: In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.), **The Rumen Microbial Ecosystem**. Blackie Academic and Professional, London, p.23-37, 1997.

SUEN, G.; WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; AYLWARD, F.O.; BOYUM, J.; DENEKE, J.; DRINKWATER, C.; IVANOVA, N.N.; MIKHAILOVA, N.; CHERTKOV, O.; GOODWIN, L.A.; CURRIE, C.R.; MEAD, D.; BRUMM, P.J. The Complete Genome Sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 Reveals a Cellulolytic and Metabolic Specialist. **PloS One**, v.6, e18814, 2011.

SYLVESTER, J.T.; KARNATI, S.K.R.; DEHORITY, B.A.; MORRISON, M.; SMITH, G.L.; ST-PIERRE, N.R.; FIRKINS, J.L. Rumen ciliated protozoa decrease generation time and adjust 18S ribosomal DNA copies to adapt to decreased transfer interval, starvation, and monensin. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.256-269, 2009.

TAKAHASHI, T.; MORI, A.; ODA, H.; MURAYAMA, I.; KOUNO, M.; SAKO, T. Comparison of cholesterol levels among lipoprotein fractions separated by anion-exchange high-performance liquid chromatography in periparturient Holstein-Friesian dairy cows. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.83, p.260-266, 2021.

THERMOFISHER, SCIENTIFIC. **Real-Time PCR: Understanding Ct**. (2016). Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>> Acesso em: 27 fev. 2024.

THOMPSON, L.R.; ROWNTREE, J.E. Invited Review: Methane sources, quantification, and mitigation in grazing beef systems. **Applied Animal Science**, v.36, p.556-573, 2020.

TRAUTMANN, A., SCHLEICHER, L., KOCH, A., GÜNTHER, J., STEUBER, J., SEIFERT, J. A shift towards succinate-producing *Prevotella* in the ruminal microbiome challenged with monensin. **Proteomics**, v.23, 2200121, 2023.

TRIPATHI, M.K.; RAGHUVANSI, S.K.S.; MONDAL, D.; KARIM, S.A. Effect of Bt-cottonseed meal feeding on performance, fermentation, ciliates population and microbial hydrolytic enzymes in lamb. **African Journal of Biotechnology**, v.13, p.509-522, 2014.

UNGERFELD, E.M. Metabolic Hydrogen Flows in Rumen Fermentation: Principles and Possibilities of Interventions. **Frontiers in Microbiology**, v.11, 589, 2020.

URRUTIA, N.; BOMBERGER, R.; MATAMOROS, C.; HARVATINE, K.J. Effect of dietary supplementation of sodium acetate and calcium butyrate on milk fat synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.5172–5181, 2019.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Cornell University Press, Ithaca, 1994.

VELOZ, C.C. **Effect of Increasing Levels of Gossypol and Fatty Acids Coming from Whole Cottonseed on Rumen Fermentation, Nutrient Digestibility and Microbial Community Composition in Continuous Culture Fermenters**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais, Laticínios e Veterinárias) – Universidade do Estado de Utah.

VERAS, R.M.L.; FERREIRA, M.A.; CARVALHO, F.F.R.; VÉRAS, A.S.C. Forage cactus (*Opuntia ficus-indica* Mill) meal in replacement of corn: 1. Apparent digestibility of 88nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1302-1306, 2002.

WALLACE, R. J. The proteolytic systems of ruminal microorganisms. **Annales de Zootechnie**, v.45, p.301-308, 1996.

WALLACE, R.J.; ONODERA, R.; COTTA, M.A. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. Springer: Dordrecht, 1997, p.283-328.

WAMPLER, J.L.; MARTIN, S.A.; HILL, G.M. Effects of laidlomycin propionate and monensin on glucose utilization and nutrient transport by *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2730-2736, 1998.

WANG, W.-K.; WANG, Y.-L.; LI, W.-J.; WU, Q.-C.; LI, S.-L.; YANG, H.-J. Gossypol Exhibited Higher Detrimental Effect on Ruminal Fermentation Characteristics of Low-Forage in Comparison with High-Forage Mixed Feeds. **Toxics**, v.9, 51, 2021.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds.) **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997, p.73–139.

WOLIN, M.J. A theoretical rumen fermentation balance. **Journal of Dairy Science**, v.43, p.1452-1459, 1960.

ZAMBRANO, W.J.; MARQUES JUNIOR, A.P. Perfil metabólico de vacas mestiças leiteiras do pré-parto ao quinto mês da lactação. **Zootecnia Tropical**, v.27, p.475-488, 2009.

ZHANG, J.; SHI, H.; WANG, Y.; LI, S.; CAO, Z.; JI, S.; HE, Y.; ZHANG, H. Effect of Dietary Forage to Concentrate Rations on Dynamic Profile Changes and Interactions of Ruminal Microbiota and Metabolites in Holstein Heifers. **Frontiers in Microbiology**, v.8, 2206, 2017.

IV – CAPÍTULO 2

EFEITO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DE ALGAROBA OU MONENSINA, EM DIETAS CONTENDO OU NÃO CAROÇO DE ALGODÃO SOBRE A POPULAÇÃO BACTERIANA DO RÚMEN E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE DE VACAS

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato enriquecido com alcalóides piperidínicos de algaroba (APA) e da monensina (MON) em dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), sobre a população bacteriana do rúmen, consumo e digestibilidade de ácidos graxos e perfil de ácidos graxos do leite de vacas. As dietas experimentais consistiram em: dieta controle sem aditivo; duas dietas sem CA, contendo APA (8 mg/kg MS) ou MON (15 mg/kg MS); e duas dietas com CA contendo APA (8 mg/kg MS) ou MON (15 mg/kg MS). Foram utilizadas 5 vacas mestiças Holandês x Gir (grau de sangue variando de ½ a ¾ de sangue H x Gir), pluríparas, com produção média diária de $29,5 \pm 7,15$ kg/leite, com peso corporal médio de $487 \pm 7,25$ kg e média de 100 ± 20 dias de lactação. Foram distribuídas em delineamento quadrado latino 5 x 5, em um período experimental de 130 dias, divididos em 5 períodos de 26 dias, com 21 dias de adaptação e 5 para coleta de amostras. Foi observado aumento da abundância relativa (AbR) no filo *Firmicutes* Gram-negativos ($P < 0,0001$) nos tratamentos APA e MON. APA aumentou ainda a AbR dos filios *Proteobacteria* ($P = 0,0001$) e *Bacteroidetes* ($P < 0,0001$). As dietas contendo CA aumentaram a AbR de *Firmicutes* Gram-positivas ($P < 0,0001$). Sobre o perfil de ácidos graxos do leite, APA influenciou apenas as concentrações de C6:0 ($P = 0,0029$) e C8:0 ($P = 0,0007$). Em contrapartida, CA aumentou as concentrações de AGCL ($P < 0,0001$), AGI ($P < 0,0001$), AGMI ($P < 0,0001$), *trans* total ($P = 0,0162$) e reduziu a atividade da enzima Δ^9 -dessaturase em ácidos graxos com 18 carbonos ($P < 0,0001$). APA altera a população bacteriana no rúmen e o CA altera o perfil de ácidos graxos do leite, sem influência dos aditivos.

Palavras-chave: Aditivos alimentares, AGCC, bactérias, *Prosopis juliflora*

EFFECT OF MESQUITE ALKALOID EXTRACT OR MONENSIN, IN DIETS CONTAINING OR NOT COTTONSEED ON THE RUMEN BACTERIAL POPULATION AND FATTY ACID PROFILE OF COW'S MILK

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of mesquite piperidine alkaloid (MPA)-enriched extract and monensin (MON) in diets containing or not cottonseed (CS) on the rumen bacterial population, fatty acid intake and digestibility, and fatty acid profile of cows' milk. The experimental diets consisted of: control diet without additive; two diets without CS, containing MPA (8 mg/kg DM) or MON (15 mg/kg DM); and two diets with CS containing MPA (8 mg/kg DM) or MON (15 mg/kg DM). Five crossbred Holstein x Gir cows (blood grade ranging from ½ to ¾ of H x Gir blood), multiparous, with an average daily production of 29.5 ± 7.15 kg/milk, an average body weight of 487 ± 7.25 kg, and an average of 100 ± 20 days of lactation were used. They were distributed in a 5 x 5 Latin square design, in an experimental period of 130 days, divided into 5 periods of 26 days, with 21 days of adaptation and 5 for sample collection. An increase in the relative abundance (RAb) of the Gram-negative Firmicutes phylum ($P < 0.0001$) was observed in the MPA and MON treatments. MPA also increased the AbR of the Proteobacteria ($P = 0.0001$) and Bacteroidetes ($P < 0.0001$) phyla. Diets containing CS increased the RAb of Gram-positive Firmicutes ($P < 0.0001$). Regarding the milk fatty acid profile, MPA influenced only the concentrations of C6:0 ($P = 0.0029$) and C8:0 ($P = 0.0007$). In contrast, CS increased the concentrations of LCFA ($P < 0.0001$), UFA ($P < 0.0001$), MUFA ($P < 0.0001$), total *trans* ($P = 0.0162$) and reduced the activity of the enzyme $\Delta 9$ -desaturase in fatty acids with 18 carbons ($P < 0.0001$). MPA alters the bacterial population in the rumen and CS alters the fatty acid profile of milk, without influence of additives.

Keywords: bacteria, food additives, *Prosopis juliflora*, SCFA

1 – INTRODUÇÃO

O leite bovino é caracterizado por ser um alimento rico em proteínas, minerais, vitaminas, açúcares e lipídios (gordura). Dentre os principais componentes do leite, a gordura tem sido bastante investigada por pesquisadores por conta de sua composição ser constituída prioritariamente de ácidos graxos (AG) saturados, com cadeias de 4 a 16 carbonos, resultantes da síntese *de novo* (Eifert et al., 2006). Apesar de haver controvérsias, alguns destes AG são suspeitos de contribuírem com a incidência de doenças cardiovasculares, por conta do aumento da lipoproteína de baixa densidade (LHL) (Maki et al., 2021). Em contrapartida, é de interesse que as concentrações de ácidos graxos de cadeia longa, mono e poliinsaturados no leite aumentem, o que resulta em aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL), redutor da incidência de doenças coronarianas (Sluijs et al., 2012; Sendra, 2020).

Desta forma, algumas fontes lipídicas, associadas ou não à aditivos alimentares, são utilizados na alimentação de ruminantes leiteiros com o objetivo de alterar o perfil de AG do leite, com redução de AG saturados e aumento da concentração de AG insaturados. Dentre eles, o caroço de algodão (CA) como fonte lipídica e a monensina como aditivo alimentar, têm sido utilizados na alimentação de vacas lactantes.

Na bovinocultura leiteira o CA tem sido bastante utilizado por aumentar a produção e alterar a composição do leite, com aumento de rendimento de AG, com destaque para os oriundos da biohidrogenação ruminal, além de aumentar a digestibilidade de AG com 16 carbonos (Rico et al., 2017), além de inibir alguns microrganismos ruminais, como bactérias produtoras de H₂ e protozoários, o que reduz a produção de metano (CH₄) (Martin et al., 2010).

Já a monensina sódica, ionóforo utilizado na alimentação de ruminantes como promotor de crescimento, tem proporcionado aumento na concentração de isômeros C18:1 *trans* e redução nas taxas de hidrólise dos ácidos graxos, assim como na velocidade e extensão da biohidrogenação (Fellner et al., 1997). Quando associada a uma fonte lipídica, a monensina aumenta ainda a concentração do isômero C18:1 *trans*-10 no leite (Jenkins et al., 2003).

No entanto, apesar de sua eficiência como aditivo alimentar para ruminantes, a monensina teve seu uso banido pela União Europeia, em conformidade com o Regulamento (CE) N° 1831/2002 e com o princípio da precaução, devido à possibilidade de resistência aos antibióticos em seres humanos, e na ocorrência de resíduos em alimentos de origem animal.

Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de avaliar o efeito de extratos vegetais como alternativa ao uso de ionóforos, sobre a resposta produtiva do animal e sobre a população de microrganismos ruminais. Dentre eles, o extrato enriquecido com alcalóides piperidínicos de algaroba (APA) tem se mostrado promissor em ovinos (Brito et al., 2020; Sousa et al., 2022), com aumento no ganho de peso, rendimento de carcaça e redução na produção de gases de efeito estufa, como CO₂ e CH₄.

Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos das suplementações com extrato enriquecido de alcalóides piperidínicos de algaroba (APA) e com monensina (MON) em dietas com e sem caroço de algodão para vacas lactantes sobre o consumo e digestibilidade de AG dietéticos, população bacteriana no rúmen e perfil de ácidos graxos no leite de vacas.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Protocolo experimental

Todos os procedimentos experimentais envolvendo animais foram conduzidos de acordo com os padrões éticos de pesquisa e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), conforme o protocolo original da EMBRAPA N° 133/2016 na data de 12 de maio de 2016 e posteriormente pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus Juvino Oliveira, localizada em Itapetinga-BA, sob o N° 223/2023.

2.2. Obtenção da matéria-prima vegetal

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

Em uma lona plástica as vagens foram espalhadas em estufa de vegetação e revolvidas diversas vezes, durante 5 dias para perda da umidade antes do início do processamento. As vagens foram trituradas em triturador estacionário, no laboratório de Forragicultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, onde posteriormente foram processadas em moinho tipo Wiley com utilização de peneira de 2 mm (Nogueira DPM 2), obtendo-se a farinha integral, que foi embalada em sacos de polietileno e acondicionada em freezer a -20°C para conservação.

2.3. Obtenção do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba

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

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

Solubilizou-se parte do EEB (100g) em solução aquosa de ácido acético 1,6 M (AcOH, 200 mL), a solução resultante foi filtrada obtendo-se a solução aquosa ácida I (SAA-I). A SSA-I foi fracionada com clorofórmio (CHCl₃), em duas lavagens sucessivas de 150 mL, obtendo-se a solução aquosa ácida II (SAA-II). A SAA-II foi alcalinizada com hidróxido de sódio (NaOH) até atingir pH 9,0, passando a ser denominada de solução aquosa básica I (SAB-I).

A SAB-I foi submetida a tripla lavagem com 100 mL de CHCl₃, obtendo-se a solução aquosa básica II (SAB-II). Esta foi submetida à dupla lavagem com solução de cloreto de sódio 10% (NaCl), resultando na solução aquosa básica III (SAB-III) que posteriormente foi desidratada com 5 g de sulfato de sódio (Na₂SO₄), homogeneizada e deixada em repouso durante 2 horas. Após filtração, a solução foi transferida para um balão de fundo redondo e no evaporador rotativo a 57°C o clorofórmio foi evaporado, obtendo-se o extrato clorofórmico básico (ECB).

Para a quantificação do rendimento de obtenção do ECB a partir do EEB, foi considerada a quantidade de 1150 g de EEB obtendo-se em torno de 17 g de ECB seco, cujo rendimento de extração foi equivalente a 1,5%. A identificação dos principais alcaloides (Tabela 1) foi realizada no Laboratório de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo e utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Shimadzu) e espectrometria de massas (Espectrômetro Amazon Speed ETD – Bruker).

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

Composto	Fórmula molecular	Massa molecular	Ocorrência relativa ¹
Juliprosinina	C ₄₀ H ₇₄ N ₃ O ₂	626,49	+++
Juliprosopina	C ₄₀ H ₇₆ N ₃ O ₂	630,48	++
Prosopina	C ₁₈ H ₃₈ NO ₃	316,26	+

¹Área relativa do pico no cromatograma; ECB = extrato clorofórmico básico.

Para preparo do extrato enriquecido de alcaloides piperidínicos de algaroba (APA), utilizou-se uma balança analítica e separadamente em Erlenmeyer o ECB foi

pesado e solubilizado com clorofórmio, transferido para funil de decantação para lavagem com HCl 10% e obtenção da subfração aquosa ácida (APA), que foi pulverizada na mistura mineral das dietas experimentais e armazenada para fornecimento aos animais.

2.4. Local, animais e delineamento experimental

A fase experimental de campo foi conduzida na Fazenda Valeu o Boi, localizada no município de Encruzilhada – BA. O clima da região, segundo a classificação de Köppen e Geiger, é do tipo “Aw”, tropical com estações bem definidas, sob as coordenadas: latitude 15° 31’ 49” Sul, longitude 40° 54’ 37” Oeste, estando a uma altitude de 915 metros. O período de verão é quente e chuvoso, compreendendo os meses de outubro a março e o período seco e frio, correspondente de abril a setembro.

Foram utilizadas 5 vacas mestiças Holandês x Zebu (grau de sangue variando de ½ a ¾ de sangue H x Z), pluríparas, com produção média diária de $29,5 \pm 7,15$ kg/leite, com peso corporal médio de $487 \pm 7,25$ kg e média de 100 ± 20 dias de lactação no início do período experimental. Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino (DQL) 5 x 5. O experimento teve duração total de 130 dias, constituído de cinco períodos experimentais, com duração de 26 dias cada, sendo os primeiros 21 dias considerados de adaptação as dietas e os cinco últimos para coleta de dados por período. Os animais foram alojados em baias individuais de 16 m², cobertas e providas de cochos e bebedouros de polietileno com capacidade de 100 litros de água, comum a duas baias, abastecidos automaticamente.

2.5. Composição das dietas experimentais e manejo alimentar

Foram utilizadas cinco dietas experimentais, sendo quatro suplementadas com APA ou monensina sódica (MON), contendo ou não caroço de algodão (CA), e uma Controle (sem aditivos e sem CA). Todas as dietas continham silagem de capim-elefante (*Cenchrus purpureus*) BRS capiaçu como volumoso e palma forrageira. Os tratamentos estão descritos abaixo:

Controle = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado sem caroço de Algodão (CA) e sem aditivos;

APA = Silagem de capiaçu + palma + concentrado sem CA, contendo 8 mg APA/kg de matéria seca (MS) da dieta;

APA + CA = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado com CA, contendo 8 mg APA/kg de matéria seca (MS) da dieta;

MON = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado sem CA, contendo 15 mg MON/kg de matéria seca (MS) da dieta;

MON + CA = Silagem de capiaçu + palma forrageira + concentrado com CA, contendo 15 mg MON/kg de matéria seca (MS) da dieta.

As dietas experimentais foram formuladas com base nas recomendações do NRC (2001), para atender as exigências de manutenção e produção média de 25 kg de leite por dia. As dietas foram compostas por volumoso e concentrado na proporção de 40:60, sendo a proporção expressa com base na MS (Tabela 2). Os aditivos (APA ou MON) foram adicionados à mistura mineral e as doses utilizadas estavam de acordo com recomendações de Costa (2022) para APA e do fabricante para monensina.

Tabela 2. Composição e perfil de ácidos graxos das dietas experimentais

Ingrediente	MS (g/kg MN)	Dietas (g/kg MS)				
		Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA
Silagem de capiaçu	231,40	330,58	330,58	359,32	330,58	359,32
Palma	50,00	457,28	457,28	446,03	457,28	446,03
Milho moído	875,60	167,71	167,71	114,30	167,71	114,30
Farelo de soja	875,20	37,90	37,90	23,32	37,90	23,32
Caroço de algodão	907,00	-	-	51,56	-	51,56
Mistura mineral ^a	928,20	4,08	4,08	3,98	4,08	3,98
Ureia	968,90	2,14	2,14	1,50	2,14	1,50
Fosfato Bicálcico	992,20	0,31	0,31	-	0,31	-
Nutriente						
Matéria orgânica		897,49	897,49	897,22	897,49	897,22
Proteína bruta		134,25	134,25	136,57	134,25	136,57
Extrato etéreo		52,75	52,75	60,74	52,35	60,74
Matéria mineral		100,17	100,17	101,40	100,17	101,40
FDN _{cp}		358,79	358,79	392,41	358,79	392,41
FDA		259,60	259,60	288,64	259,60	288,64
Celulose		228,73	228,73	254,16	228,73	254,16
Hemicelulose		173,04	173,04	176,26	173,04	176,26
Lignina		30,90	30,90	34,50	30,90	34,50
Carboidratos não fibrosos		354,63	354,63	310,69	354,63	310,69
Carboidratos totais		721,70	721,70	709,77	721,70	709,77
Energia bruta (Mcal/kg)		3,90	3,90	4,08	3,90	4,08
Ácidos graxos (g/kg MS)						
C14:0 (mirístico)		0,51	0,51	0,58	0,51	0,58
C16:0 (palmítico)		5,73	5,73	7,26	5,73	7,26
C18:0 (esteárico)		1,48	1,48	1,69	1,48	1,69
C18:1 <i>cis</i> -9 (oleico)		5,82	5,82	6,64	5,82	6,64
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 (linoleico)		0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 (linolênico)		0,36	0,36	0,39	0,36	0,39

^aMistura mineral para vacas leiteiras – Composição (mínimo): Ca: 160 g/kg; P: 85 g/kg; Na: 90 g/kg; Mg: 15 g/kg; S: 16 g/kg; Co: 70 mg/kg; Cu: 1100 mg/kg; I: 75 mg/kg; Mn: 1400 mg/kg; Se: 18 mg/kg; Zn: 4300 mg/kg; Fe: 1100 mg/kg.

2.6. Coleta de Dados e análises

2.6.1. Amostras de conteúdo ruminal e processamento

Foram coletadas no 26^o dia de cada período experimental, amostras de conteúdo ruminal (sólido + líquido) de cada animal, via sonda esofágica, quatro horas após a alimentação da manhã, as quais foram imediatamente acondicionadas em gelo. Posteriormente, foi realizada a separação das fases sólida e líquida através da filtração por quatro camadas de gaze.

Após a filtração, foram preparadas subamostras para posterior análises da diversidade microbiana.

2.6.1.1. Diversidade microbiana

Para a determinação da população bacteriana, foi realizada a extração total de DNA de acordo com metodologia adaptada de Stevenson e Weimer (2007). As adaptações ocorreram no protocolo mecânico de extração, com a utilização de um moinho de bola (Marconi®, modelo MA350, São Paulo – Brasil; três vezes por 3 minutos) e no protocolo térmico, utilizando o banho-maria (Quimis®, modelo Q215S, São Paulo – Brasil; 60°C por 10 minutos, duas vezes), com alternância entre os dois protocolos. Também foi utilizado o protocolo químico, com a combinação de fenol/clorofórmio para a extração do DNA total. Ao final do processo de extração, o DNA foi precipitado com acetato e isopropanol.

Para verificar a concentração e pureza após a extração, o DNA total foi submetido a análise por espectrofotometria (NanoDrop™, modelo 2000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts – EUA) a partir das leituras de concentração (ng/μL) e das razões A_{260}/A_{280} nm e A_{260}/A_{230} nm para indicar possível contaminação do material genético com sais tampão, fenol, clorofórmio e compostos orgânicos (Tabela 3).

Tabela 3. Quantidade e qualidade do DNA extraído

Tratamento	Amostra	Concentração (ng/μL)	A_{260/280 nm}	A_{260/230 nm}
Controle	1	87,4	1,85	1,91
	2	30,2	1,84	2,20
	3	23,8	1,85	2,19
	4	32,0	1,91	1,63
	5	20,0	1,82	1,83
APA	1	24,1	1,83	1,94
	2	111,7	1,89	2,18
	3	62,4	1,91	1,80
	4	95,5	1,88	2,19
	5	63,9	1,82	1,94
APA+CA	1	72,6	1,85	2,11
	2	25,2	1,89	1,96
	3	25,6	1,89	1,87
	4	79,2	1,89	1,96
	5	39,7	1,85	2,05
MON	1	29,4	1,85	2,15
	2	75,9	1,90	2,02
	3	36,7	1,89	1,84
	4	43,1	1,89	1,87
	5	39,1	1,77	1,78
MON+CA	1	29,7	1,84	1,82
	2	27,2	1,78	1,59
	3	28,2	1,87	1,82
	4	25,5	1,80	1,85
	5	35,9	1,83	1,94

As amostras de DNA obtidas foram diluídas para se obter um volume final de 20 ng/ μ L, a fim de se padronizar a concentração de DNA antes da utilização nos ensaios de qPCR.

Foram selecionados primers para bactérias totais e para as espécies *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium* e *Streptococcus bovis* como espécies Gram-positivas, *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amilophilus*, *Selenomonas ruminantium* e *Megasphaera elsdenii* como espécies Gram-negativas e *Archaeas* totais como produtoras de metano (Tabela 4).

A amplificação do DNA foi realizada no equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), em solução contendo 5 µL de GoTaq qPCR MasterMix (A6001 – Promega, Wisconsin, EUA), 0,5 µL de cada primer (forward e reverse (Tabela 4), 3 µL de água ultrapura (mili-Q) e 2 µL do DNA molde. As condições da termociclagem foram de 45 ciclos a 50°C por 30 segundos e a 72°C por 30 segundos. Foi utilizado um ciclo de 95°C por 10 minutos e a 95°C por 15 segundos para a desnaturação inicial. A análise de dissociação dos produtos da qPCR foi realizada a 95°C por 15 segundos, seguida do resfriamento até 60°C por 1 minuto.

Cada amostra, em duplicata, foi incluída em todas as placas além do controle negativo usando água ultrapura como molde. A detecção da fluorescência ocorre ao findarem as etapas de alongação do DNA. O número mínimo de ciclos que são necessários para que a fluorescência se torne detectável é chamado de Ct (Cycle threshold), os quais ocorrem durante a fase exponencial da reação do PCR e são utilizados nos estudos de quantificação microbiana do rúmen (Denman e McSweeney, 2005).

A abundância relativa (AbR) dos microrganismos foi calculada por meio da equação a seguir, usando-se como normalizador o gene 16S rRNA de bactérias totais (Denman e McSweeney, 2006):

$$AbR = 100 \times 2^{\Delta Ct}$$

Onde:

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{normalizador})}.$$

Tabela 4. Sequências de primers utilizados no ensaio de qPCR

Espécie	Primer set	Sequência (5'-3')	Referência
Bactérias totais	27f 342r	F: GAAGAGTTTGATCATGGCTCAG R: CTGCTGCCTCCCGTAG	Khafipour et al., (2009)
<i>Archaea</i> total	MB1174f Arch1406-1389r	F: GAGGAAGGAGTGGACGACGGTA R: ACGGGCGGTGTGTGCAAG	Ohene-Adjei et al. (2008)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	FibSuc3F FibSuc3R	F: GCGGGTAGCAAACAGGATTAGA R: CCCCCGGACACCCAGTAT	
<i>Ruminococcus albus</i>	RumAlb3F RumAlb3R	F: TGTTAACAGAGGGAAGCAAAGCA R: TGCAGCCTACAATCCGAACTAA	
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	ButFib2F ButFib2R	F: ACCGCATAAGCGCACGGA R: CGGGTCCATCTTGTACCGATAAAT	
<i>Eubacterium ruminantium</i>	EubRum2F EubRum2R	F: CTCCCGAGACTGAGGAAGCTTG R: GTCCATCTCACACCACCGGA	
<i>Prevotella ruminicola</i>	PreRum1F PreRum1R	F: GAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTG R: CATCCTATAGCGGTAAACCTTTGG	Stevenson e Weimer (2009)
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	RumAmy2F RumAmy2R	F: CTGGGGAGCTGCCTGAATG R: GCATCTGAATGCGACTGGTTG	
<i>Streptococcus bovis</i>	StrBov2F StrBov2R	F: TTCCTAGAGATAGGAAGTTTCTTCGG R: ATGATGGCAACTAACAAATAGGGGT	
<i>Selenomonas ruminantium</i>	SelRum2F SelRum2R	F: CAATAAGCATTCCGCCTGGG R: TTCACTCAATGTCAAGCCCTGG	
<i>Megasphaera elsdenii</i>	MegEls2F MegEls2R	F: AGATGGGGACAACAGCTGGA R: CGAAAGCTCCGAAGAGCCT	

Para determinação dos filos, foram considerados as seguintes espécies:

Firmicutes Gram-positivas: *R. albus*, *B. fibrisolvens*, *E. ruminantium* e *S. bovis*;

Firmicutes Gram-negativas: *S. ruminantium* e *M. elsdenii*;

Bacteroidetes: *P. ruminicola*;

Fibrobacteres: *F. succinogenes*;

Proteobacteria: *R. amylophilus*.

2.6.2. Consumo e digestibilidade dos ácidos graxos dietéticos e perfil de ácidos graxos do leite

Para determinação do consumo, o alimento fornecido e as sobras de cada animal foram pesadas do 22° ao 26° dia de cada período experimental, amostradas e acondicionadas em sacos plásticos e, em seguida armazenadas em freezer a -20°C para análises. Para determinação do consumo, foi considerado o peso da alimentação fornecida, subtraindo o peso das sobras. Para determinação do perfil de ácidos graxos do leite, foram coletadas amostras de leite de cada animal, nas duas ordenhas diárias do 22° ao 26° dia (amostra composta), e logo em seguida foram armazenadas em freezer a -20°C para análises.

Foram coletadas aproximadamente 300 g de fezes diretamente da ampola retal, no 25° dia de cada período. As fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20°C. Ao término dos períodos de coleta, as amostras de fezes foram descongeladas, pesadas, secas em estufa de ventilação forçada a 55°C, durante 72 a 96 horas e, posteriormente, moídas em moinho do tipo Wiley com peneira dotada de crivos de 1 mm e armazenadas para posterior análises.

Para determinar a digestibilidade dos nutrientes, foi utilizada a fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) como indicador interno, obtida após a incubação ruminal de 0,5 g correspondente à cada amostra de alimentos, sobras e fezes, acondicionadas em sacos confeccionados com tecido-não-tecido (TNT) gramatura 100 (100 g/m²), 5 x 5 cm por 288 horas. O resíduo foi considerado como indigestível (Detmann et al., 2012) e utilizado para estimativa de produção fecal.

2.6.2.1. Extração dos lipídios totais

2.6.2.1.1. Extração de lipídios totais dos alimentos fornecidos, sobras e fezes

A extração da fração lipídica dos alimentos fornecidos, sobras e fezes foi realizada com uma mistura de clorofórmio, metanol e água, respectivamente (2:2:1,8/ v/v/v), segundo Bligh e Dyer (1949), no qual foram pesados cerca de 15 g ($\pm 0,1$ mg) de amostra em um béquer de 250 mL e adicionado 15 mL de clorofórmio e 30 mL de metanol. Após agitação por 15 minutos, foram adicionados mais 15 mL de clorofórmio, agitados por mais 2 minutos e acrescidos 15 mL de água destilada e agitado novamente por mais 5 minutos. Posteriormente, o homogeneizado foi filtrado por meio de papel filtro Whatman n° 1 acoplado em funil Buchner usando pressão a vácuo.

Após a filtragem foi adicionado ao resíduo mais 10 mL de clorofórmio, mantendo sob agitação por 5 minutos. Realizou-se uma nova filtragem, fazendo-se uso do mesmo papel filtro e o béquer lavado com 10 mL de clorofórmio. O filtrado obtido foi transferido para um funil de separação. Após a separação das fases, a inferior contendo o clorofórmio e a matéria graxa foi drenada para um balão previamente pesado vazio, e levado para o rota-vapor (banho-maria a 33-34°C).

A matéria restante no balão foi pesada e o teor de lipídios foi determinado gravimetricamente. Após pesagem, foi adicionado 2 mL de N-heptano e o resíduo restante foi acondicionado em microtubos Eppendorf® e armazenado em freezer (2 a 8°C) para posterior transesterificação.

2.6.2.1.2. Extração dos lipídios totais do leite

Para extração dos lipídios totais do leite *in natura*, 50 mL de cada amostra descongelada foram centrifugados a 12.000 rpm durante 30 minutos, a 4°C, em centrífuga de alta rotação (Himac, modelo CF-16RX II, Ibaraki, Japão). A camada sólida formada na parte superior foi coletada e armazenada em tubos Eppendorf® para posterior análise (Reveneau, 2008). A extração lipídica das amostras baseou-se no procedimento proposto por Bligh e Dyer (1959).

2.6.2.2. Transesterificação dos triacilgliceróis

O procedimento seguiu metodologia descrita por Bannon et al., (1982). Pesaram-se aproximadamente 150 mg de lipídios extraídos de cada amostra (fornecido, sobra, fezes e leite), colocou-se em tubos com tampas rosqueáveis, adicionaram-se 5 mL de solução de metóxido de sódio 0,25mol/L em metanol-dietil éter (1:1) e agitou por 3 minutos. A essa mistura, foram adicionados 2 mL de iso-octano e 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio. O tubo foi agitado novamente e deixado em repouso para a separação das fases. A parte sobrenadante foi coletada e transferida para vial cromatográfico, devidamente identificado, para posterior análise cromatográfica.

2.6.2.3. Análise cromatográfica dos ésteres de ácidos graxos

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados por cromatógrafo a gás (Shimadzu, modelo GC-2010 Plus), equipado com Detector de Ionização de Chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida (Rt-2560; 100 m, 0,25 mm d.i). As vazões dos gases (White

Martins) foram de 40 mL/min para o gás de arraste (H₂); 30 mL/min para o gás auxiliar (N₂) e 4.000 mL/min para o ar sintético da chama.

A razão da divisão da amostra foi de 90:10. Os parâmetros de funcionamento foram estabelecidos após verificação da condição de melhor resolução. As temperaturas do injetor e detector foram 225°C e 260°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 140°C por 5 minutos, seguido por uma rampa de 3°C por minuto até atingir 245°C por 20 minutos. O tempo total de análise foi de 60 minutos. As injeções foram realizadas com volume de 0,7 µL e as áreas dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinadas através do software LCSolution®.

2.6.2.4. Identificação dos ésteres metílicos

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação de tempo de retenção dos constituintes da amostra com uma mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Mix C4-C24-18919-1 AMP, Supelco) e por comparação com os tempos de retenção com os ésteres metílicos de padrões contendo os isômeros geométricos *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico (O-5632 Sigma, EUA). Para a avaliação da resposta do detector de ionização de chama foi utilizada uma solução de mistura constituída de padrões (Sigma) de ésteres metílicos de ácidos graxos em concentração conhecida, sendo calculado através da equação proposta por Ackman (1972). Estes fatores foram obtidos a partir da média de sete repetições:

$$FR = \frac{A_{23:0} \times C_x}{A_x \times C_{23:0}}$$

Em que: FR= Fator de resposta em relação ao tricosanoato de metila; A_{23:0} = Área do tricosanoato de metila; C_x = Concentração de ésteres metílicos de ácidos graxos; A_x = Área do éster metílico de ácido graxos e C_{23:0}= Concentração tricosanoato de metila.

A quantificação de ácidos graxos das amostras de alimentos fornecidos, sobras, fezes e leite *in natura* em mg/g de lipídeos totais foi realizada utilizando o padrão interno tricosanoato de metila (23:0) (Sigma, EUA). Após a pesagem dos lipídeos (~150 mg) para transesterificação foram adicionados a todas as amostras com auxílio de uma micropipeta, 1000 µL da solução de padrão interno com concentração conhecida (1,00

g/mL). Os cálculos da concentração dos ácidos graxos contidos nas amostras foram realizados conforme (Visentainer e Franco, 2006).

$$C(\text{mg/g}) = \frac{A_x \times M_{23:0} \times \text{FRT}}{A_{23:0} \times MA \times \text{FCT}}$$

Em que: AX = Área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos; M23:0 = Massa do padrão interno adicionado a amostra (em miligramas); FRT = Fator de resposta teórico dos ésteres metílicos de ácidos graxos; A23:0 = Área do padrão interno; MA = Massa da amostra (em gramas) e FCT = Fator de conversão para expressar os resultados em mg de ácidos graxos/g de lipídios totais (LT).

2.6.2.5. Avaliação da qualidade nutricional dos lipídios do leite *in natura*

Os ácidos graxos desejáveis foram calculados por meio do somatório dos ácidos: (C18:0+AGMI+AGPI). A qualidade nutricional da fração lipídica do leite *in natura* foi avaliada por meio do índice de aterogenicidade (IA) e índice de trombogenicidade (IT), a partir dos resultados obtidos para os ácidos graxos encontrados nas amostras. Os cálculos foram realizados segundo Ulbricht e Southgate (1991):

$$IA = \frac{(C_{12:0} + (4 \times C_{14:0}) + C_{16:0})}{(\sum AGMI + \sum n6 - \sum n3)}$$

$$IT = \frac{(C_{14:0} + C_{16:0} + C_{18:0})}{((0,5 \times \sum AGMI) + (0,5 \times \sum n6) + (3 \times \sum n3) + \left(\frac{\sum n3}{\sum n6}\right))}$$

Em que: $\sum AGMI$ = Somatório de ácidos graxos monoinsaturados; $\sum n-6$ = somatório dos ácidos graxos da família ômega-6; $\sum n-3$ = somatório dos ácidos graxos da família ômega-3; e $\sum n-3/\sum n-6$ = relação dos ácidos graxos da família ômega 6 e 3.

A relação entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) foi calculada segundo Santos-Silva et al. (2002):

$$HH = \frac{(C_{18:1n9c} + C_{18:2n6} + C_{20:4n6} + C_{18:3n3} + C_{20:5n6} + C_{22:6n3})}{(C_{14:0} + C_{16:0})}$$

Após a identificação dos ácidos graxos, procedeu a determinação dos índices de $\Delta 9$ dessaturase, conforme as equações propostas por Bichi et al. (2012) e Malau-Aduli et al. (1997):

$$\Delta 9 \text{ dessaturase } 14 = \frac{C14:1}{(C14:1 + C14:0)}$$

$$\Delta 9 \text{ dessaturase } 16 = \frac{C16:1}{(C16:1 + C16:0)}$$

$$\Delta 9 \text{ dessaturase } 18 = \frac{C18:1}{(C18:1 + C18:0)}$$

2.7. Análise estatística

Para os dados de abundância relativa das bactérias ruminais, realizou-se avaliação das pressuposições de distribuição normal, com o teste de normalidade de resíduo Shapiro-Wilk. Os dados de todas as variáveis analisadas foram submetidos a análise de variância (ANOVA). O modelo utilizado para análise dos dados, foi:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + C_j + P_k + e_{ijk}$$

Onde:

Y_{ijk} = variável dependente; μ = média das observações; D_i = efeito dos tratamentos experimentais; C_j = efeito da vaca; P_k = efeito de período; e_{ijk} = erro experimental associado a cada observação.

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do programa Statistical Analysis System (SAS OnDemand for Academics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e as médias das tabelas foram obtidas pelo comando LSMEANS e quando significativas, foram comparadas pelo teste de Tukey. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os consumos de MS e FDNcp não foram influenciados ($P>0,05$) pelas dietas, exceto para FDNcp que foi menor na dieta MON sem CA (Tabela 5). No entanto, os consumos de EE ($P=0,0045$) e ácidos graxos totais ($P=0,0008$), AG com C16 ($P=0,0006$) e AG com C18 ($P=0,0031$) foram influenciados, em que as dietas contendo CA apresentaram as maiores médias.

A dieta MON apresentou as maiores médias para digestibilidade de MS ($P=0,0224$) e de FDNcp ($P=0,0045$). Entretanto, MON+CA apresentou as menores médias para as mesmas variáveis, juntamente com a dieta APA para DFDNcp (Tabela 5). As digestibilidades de EE, AG totais e AG com C18 não foram influenciadas ($P>0,05$), mas foi observado aumento na digestibilidade de AG com C16 ($P=0,0351$) na dieta APA+CA e redução na dieta MON.

Tabela 5. Consumo de nutrientes e digestibilidade aparente de ácidos graxos (AG) em vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Variável	Dietas					EPM ¹	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
	Consumo						
MS (kg/dia)	20,70	21,08	19,41	19,70	19,08	0,6839	0,5214
FDNcp (g/kg PC)	12,13 ^a	12,21 ^a	12,32 ^a	10,01 ^b	12,34 ^a	0,5023	0,0312
EE (kg/dia)	1,19 ^{bc}	1,39 ^{ab}	1,55 ^a	1,11 ^c	1,44 ^a	0,0518	0,0005
AG total (kg/dia)	0,27 ^b	0,27 ^b	0,34 ^a	0,25 ^b	0,34 ^a	0,0123	0,0008
AG 16 C (kg/dia)	0,05 ^b	0,05 ^b	0,07 ^a	0,05 ^b	0,07 ^a	0,0025	0,0005
AG 18 C (kg/dia)	0,11 ^{bc}	0,11 ^{bc}	0,14 ^a	0,10 ^c	0,13 ^{ab}	0,0045	0,0031
	Digestibilidade aparente, %						
MS	66,29 ^{ab}	61,15 ^{ab}	62,86 ^{ab}	66,45 ^a	60,02 ^b	1,2195	0,0224
FDN	55,34 ^{ab}	48,57 ^c	55,16 ^{ab}	57,29 ^a	50,57 ^{bc}	0,9053	0,0045
EE	84,20	80,70	85,57	80,37	85,27	1,4320	0,1278
AG Total	70,85	77,83	69,17	77,59	74,11	1,1627	0,0853
AG C16	31,89 ^{ab}	31,33 ^{ab}	33,69 ^a	31,20 ^b	31,49 ^{ab}	0,2862	0,0351
AG C18	65,89	66,59	64,82	67,41	66,30	0,3488	0,3316

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$); ¹Erro padrão da média.

Os aditivos alimentares APA e MON, assim como o CA, não limitaram o consumo de MS, no entanto, o consumo de FDN_{cp} reduziu com MON na dieta sem CA. Relatos da literatura mostram redução significativa nos consumos de MS e FDN em vacas lactantes suplementadas com monensina (Ahvanooei et al., 2023), possivelmente, por reduzir a taxa de passagem (Schelling et al., 1984).

O aumento no consumo de EE e, conseqüentemente, de ácidos graxos dietéticos nas dietas com CA se deu pela presença do caroço de algodão, por ser uma fonte lipídica rica em ácidos graxos de cadeia média e longa, principalmente com 16 e 18 carbonos. Desta forma, como mostrado na Tabela 5, os aditivos alimentares não interferiram no consumo de AG, uma vez que este é influenciado pela fonte lipídica presente na dieta.

As digestibilidades da MS e FDN_{cp} foram maiores com MON, possivelmente, o fator que causou este efeito foi o aumento da extensão de digestão da fibra em dieta com MON sem CA, possivelmente por aumentar o tempo de permanência da fibra para digestão no rúmen (Osborne et al., 2004). No entanto, quando associado ao CA, as digestibilidades de MS e FDN_{cp} diminuíram. A redução da digestibilidade da FDN_{cp} também foi observada na dieta APA, que não alterou o consumo de FDN, indicando que afetou atividade fibrolítica no rúmen. Apesar de ter apresentado a maior média para DMS e DFDN_{cp}, a dieta MON não diferiu estatisticamente do controle, o que está de acordo com os resultados de Vendramini et al. (2016), que não observaram influência significativa na digestibilidade destas variáveis em vacas lactantes suplementadas com monensina. Os mesmos autores encontraram coeficiente de digestibilidade da MS em torno de 64%, em animais recebendo dieta mista com relação volumoso:concentrado de 50:50, suplementada com monensina, próximo dos valores encontrados no presente trabalho, que utilizou relação V:C de 40:60. No entanto, a DFDN_{cp} observada pelos mesmos autores (41%) foi menor do que a encontrada no presente estudo (57,29%).

Apesar do aumento na ingestão de AG nas dietas contendo CA, a digestibilidade dos AG com C18 não foi influenciada pelas dietas, indicando que a quantidade de lipídeos na dieta não foi excessiva e a biohidrogenação ruminal não interferiu nos processos de digestão e absorção de AG no intestino, sendo mais afetados pelo tipo e quantidade de AG na dieta. A extensão de biohidrogenação no rúmen varia de acordo com o estabelecimento de microbiota para degradar vários tipos de carboidratos, que sejam predominantes em lipólise, produção de ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) e redução deste a esteárico. (Karnati et al., 2009).

A abundância relativa (AbR) de Filos de bactérias ruminais (Tabela 6) foi influenciada pelas dietas experimentais ($P < 0,05$), em que as dietas com aditivos reduziram a AbR de *Firmicutes* Gram-positivos, independente da presença de CA. Para o Filo *Firmicutes* representado por bactérias Gram-negativas, observou-se aumento ($P < 0,0001$) com a suplementação de APA ou MON, sendo que MON associado ao CA mostrou menor abundância de espécies semelhante à dieta controle. APA e MON estimularam ($P < 0,0001$) *Bacteroidetes* (*P. ruminicola*) e MON + CA reduziu ($P < 0,0001$). Para o Filo *Fibrobacteres* (*F. succinogenes*) tanto APA quanto MON promoveram inibição ($P < 0,0001$). O Filo *Proteobacteria* (*R. amylophilus*) proliferou ($P < 0,0001$) na presença de APA e foi afetada ($P < 0,0001$) por MON e CA. ($P = 0,0001$) (Tabela 6).

Tabela 6. Abundância Relativa (AbR) de genes de 16S rRNA de Filos de bactérias do rúmen de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Filo	Dietas					EPM ¹	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
<i>Firmicutes</i> Gram +	0,6922 ^c	0,3856 ^{cd}	1,8335 ^a	0,2211 ^d	1,2224 ^b	0,1245	<0,0001
<i>Firmicutes</i> Gram -	5,9509 ^c	22,0117 ^b	27,7111 ^a	22,1112 ^b	2,7434 ^c	2,1332	<0,0001
<i>Bacteroidetes</i>	0,0002 ^c	0,0029 ^b	0,0025 ^b	0,0067 ^a	0,0005 ^c	0,0005	<0,0001
<i>Fibrobacteres</i>	0,2352 ^a	0,0259 ^c	0,1348 ^b	0,0615 ^{bc}	0,0445 ^{bc}	0,0179	<0,0001
<i>Proteobacteria</i>	0,1442 ^b	0,4884 ^a	0,1369 ^{bc}	0,0328 ^{cd}	0,0034 ^d	0,0365	0,0001

Firmicutes Gram + = *R. albus*, *B. fibrisolvens*, *E. ruminantium* e *S. bovis*; *Firmicutes* Gram - = *S. ruminantium* e *M. elsdenii*; *Bacteroidetes* = *P. ruminicola*; *Fibrobacteres* = *F. succinogenes*; *Proteobacteria* = *R. amylophilus*. Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹Erro padrão da média.

O perfil de ácidos graxos saturados (AGS) do leite foi afetado ($P < 0,05$) pelas dietas experimentais (Tabela 7), em que, independentemente do aditivo, as dietas sem CA apresentaram as maiores médias para os ácidos caprótico (C6:0; $P = 0,0029$), caprílico (C8:0; $P = 0,0007$), cáprico (C10:0; $P < 0,0001$), láurico (C12:0; $P = 0,0001$) e mirístico (C14:0; $P < 0,0001$). Entretanto, apresentaram as menores médias para o ácido esteárico (C18:0; $P < 0,0001$). As dietas contendo CA apresentaram as maiores médias para C18:0.

Tabela 7. Composição dos ácidos graxos saturados (AGS) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Ácidos graxos ¹	Dietas					EPM ²	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
C4:0	1,28	1,20	1,31	0,98	1,17	0,1592	0,1068
C6:0	2,58 ^{ab}	2,69 ^a	2,47 ^{ab}	2,59 ^{ab}	2,29 ^b	0,0665	0,0029
C8:0	1,75 ^{ab}	1,94 ^a	1,53 ^{bc}	1,78 ^{ab}	1,46 ^c	0,0558	0,0007
C10:0	3,62 ^a	4,10 ^a	2,86 ^b	3,79 ^a	2,73 ^b	0,1563	<0,0001
C12:0	4,20 ^a	4,83 ^a	3,13 ^b	4,48 ^a	2,94 ^b	0,1863	0,0001
C14:0	13,02 ^a	13,76 ^a	11,07 ^b	13,35 ^a	10,32 ^b	0,3443	<0,0001
C16:0	35,27	34,67	32,08	35,36	33,51	0,6265	0,1296
C18:0	9,52 ^b	10,06 ^b	14,15 ^a	9,49 ^b	14,95 ^a	0,6413	<0,0001
C20:0	1,94	1,56	1,58	1,60	1,47	0,0710	0,6423
C22:0	0,11	0,09	0,09	0,11	0,11	0,0051	0,1431

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹Nomeclatura usual expresso em g/100 g de gordura; ²Erro padrão da média; C4:0 = butírico; C6:0 = capríco; C8:0 = caprílico; C10:0 = cáprico; C12:0 = láurico; C14:0 = mirístico; C16:0 = palmítico; C18:0 = esteárico; C20:0 = araquídico; C22:0 = behênico.

Foi observado que APA e MON reduziram e o CA aumentou a prevalência de *Firmicutes* Gram-positivas. Este filo aqui representado por *R. albus*, *B. fibrisolvens*, *E. ruminantium* e *S. bovis*. Weimer et al. (2008) registraram uma diminuição de *B. fibrisolvens*, mas não de *E. ruminantium*, associada com a alimentação de bovinos leiteiros com monensina. Estas duas espécies são predominantes na lipólise, na produção de ácido vacênico (AV; 18:1 *trans*-11) e redução do AV a ácido esteárico (C18:0). Consequentemente, isto pode explicar o aumento do ácido esteárico no leite de vacas alimentadas com CA, devido ao aumento de bactérias importantes na biohidrogenação.

Os aditivos alimentares não influenciaram a maioria dos ácidos graxos saturados (AGS) do leite, com exceção dos ácidos caproico (C6:0) e caprílico (C8:0), em que a dieta APA apresentou as maiores médias. Os AG C6:0 e C8:0, juntamente com o ácido cáprico (C10:0) são típicos do leite de cabra, podendo chegar até 18% do total de AGs do leite, em comparação com o leite de vaca que pode chegar até 9% (Chilliard et al., 2006). O aumento da concentração desses AGs de cadeia curta no leite de vaca está relacionado com a melhoria na digestibilidade do leite (Mollica et al., 2021), apesar de serem responsáveis por conferir sabor e odor ao leite, quando na forma livre (Busetti, 2006).

Os ácidos graxos mono (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) foram afetados pelas dietas experimentais ($P < 0,05$), em que as dietas contendo CA (Tabela 8) apresentaram as menores médias para o ácido miristoleico (C14:1; $P = 0,0119$). No entanto, apresentaram maiores médias para os ácidos elaídico (C18:1 *trans*-9; $P = 0,0068$), oleico (C18:1 *cis*-9; $P < 0,0001$) e γ -linoleico (C18:2n6; $P < 0,0001$). Todas dietas experimentais suplementadas com aditivos (APA ou MON) apresentaram menores médias para o ácido α -linolênico (C18:3n3; $P = 0,0456$).

Tabela 8. Composição dos ácidos graxos mono (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Ácidos graxos ¹	Dietas					EPM ²	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
C14:1	1,34 ^a	1,32 ^a	1,00 ^{ab}	1,30 ^a	0,84 ^b	0,0788	0,0119
C16:1	1,57	1,43	1,29	1,61	1,17	0,0897	0,0774
C18:1 <i>trans</i> -9	1,31 ^{ab}	1,11 ^b	1,46 ^a	1,22 ^{ab}	1,50 ^a	0,0641	0,0068
C18:1 <i>cis</i> -9	17,72 ^b	16,70 ^b	21,63 ^a	17,50 ^b	21,24 ^a	0,6720	<0,0001
C18:2n6	0,12 ^b	0,12 ^b	0,20 ^a	0,13 ^b	0,20 ^a	0,0102	<0,0001
C18:3n6	0,22	0,23	0,21	0,23	0,23	0,0062	0,4795
C18:3n3	0,07 ^a	0,06 ^{ab}	0,06 ^{ab}	0,06 ^{ab}	0,05 ^b	0,0030	0,0456
C20:3n6	0,11	0,11	0,10	0,12	0,10	0,0043	0,2211
C22:1n9	0,04	0,05	0,03	0,04	0,04	0,0036	0,3639
C20:3n3	0,09	0,09	0,07	0,10	0,09	0,0052	0,0845

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$); ¹Nomeclatura usual expresso em g/100 g de gordura; ²Erro padrão da média; C14:1 = miristoleico; C16:1 = palmitoleico; C18:1 *trans*-9 = elaídico; C18:1 *cis*-9 = oleico; C18:2n6 = γ linoleico; C18:3n6 = γ linolênico; C18:3n3 = α linolênico; C20:3n6 = di-homo α linolênico; C22:1n9 = erúico; C20:3n3 – eicosatrienoico.

Foi observada redução no perfil de AGS de cadeia curta e média (C4:0 a C16:0) e do ácido graxo monoinsaturados (AGMI) C14:1 nas dietas com CA, o que já era esperado, uma vez que o CA contém em média 72,9% de ácidos graxos insaturados (Gondim-Tomaz et al., 2016), que apresentam efeito inibitório direto na atividade da enzima acetil-CoA carboxilase na glândula mamária, o que reduz a porcentagem de AGS de cadeia curta, média e AGMI na gordura do leite (Barber et al., 1997; Fernandes et al., 2008). Os resultados para AGS e AGMI do presente estudo estão de acordo com Costa et al. (2018), que identificaram redução no perfil de AGS de cadeia curta e média e AGMI no leite de vacas mestiças alimentadas com dietas contendo CA.

Em contrapartida, as dietas contendo CA promoveram maiores concentrações dos ácidos esteárico (C18:0), elaídico (C18:1 *trans*-9), oleico (C18:1 *cis*-9) e γ -linoleico

(C18:2n6), o que pode ser explicado pelo fato do CA ter como principal AG o linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12), que pode ser rapidamente convertido em C18:0 e C18:1 durante o processo de biohidrogenação, o que resulta em aumento do fluxo de C18:0, C18:1 e C18:2 para o intestino delgado e direcionamento para a glândula mamária pela corrente sanguínea (Jenkins et al., 2008; Bales et al., 2024).

Vale ressaltar que o ácido elaídico está associado a efeitos negativos na saúde cardiovascular (Almeida et al., 2014; Vahmani et al., 2017), de forma que o aumento de sua concentração na gordura do leite não é desejável. No presente estudo, a dieta contendo APA sem CA reduziu a concentração do ácido elaídico.

Foi observada redução discreta na concentração do ácido α -linolênico (C18:3n3) nas dietas suplementadas, especialmente com MON+CA. O mesmo efeito foi observado por Mutsvangwa et al. (2003), que relataram redução na concentração de C18:3n3 no leite de vacas lactantes suplementadas com monensina. No entanto, não se sabe ao certo como ocorre essa influência. Apesar de as dietas com APA terem apresentado redução na concentração de C18:3n3 no leite, não diferiram do controle, com diferença de 0,01 g/100 g de AG entre essas dietas.

As dietas experimentais influenciaram ($P < 0,05$) o perfil de ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR; Tabela 9), em que as dietas contendo CA apresentaram as menores médias para os ácidos pentadéclico (C15:0; $P = 0,0071$), *iso*-pentadéclico (C15:0 *iso*; $P < 0,0001$) e *anteiso*-pentadéclico (C15:0 *anteiso*; $P = 0,0002$). As dietas APA e MON não diferiram da dieta controle para os mesmos ácidos.

Tabela 9. Composição dos ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Ácidos graxos ¹	Dietas					EPM ²	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
C11:0	0,51	0,57	0,39	0,55	0,36	0,0276	0,0680
C13:0	0,26	0,28	0,18	0,28	0,17	0,0141	0,0960
C15:0	1,00 ^a	1,01 ^a	0,82 ^b	1,05 ^a	0,80 ^b	0,0245	0,0071
C15:1 <i>cis</i> -9	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,0023	0,4641
C15:0 <i>iso</i>	0,26 ^a	0,26 ^a	0,20 ^b	0,27 ^a	0,20 ^b	0,0070	<0,0001
C15:0 <i>anteiso</i>	0,47 ^a	0,47 ^a	0,38 ^b	0,49 ^a	0,37 ^b	0,0122	0,0002
C17:0	0,41	0,35	0,34	0,42	0,41	0,0211	0,0890
C17:1 <i>cis</i> -9	0,18	0,14	0,16	0,16	0,14	0,0078	0,3400
C17:0 <i>iso</i>	0,28	0,23	0,23	0,29	0,28	0,0149	0,2966
C17:0 <i>anteiso</i>	0,37	0,31	0,30	0,38	0,37	0,0195	0,3830
C21:0	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,0011	0,0964

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05);

¹Nomeclatura usual expresso em g/100 g de gordura; ²Erro padrão da média; C11:0 = hendecanóico; C13:0 = tridecanóico; C15:0 = pentadecílico; C15:1 *cis*-9 = pentadecenóico; C15:0 *iso* = *iso* pentadecílico; C15:0 *anteiso* = *anteiso* Pentadecílico; C17:0 = margárico; C17:1 *cis*-9 = 10-heptadecenóico; C17:0 *iso* = *iso* margárico; C17:0 *anteiso* = *anteiso* margárico; C21:0 = heneicosanóico; C23:0 = tricosanóico.

Os AGCIR do leite de vacas são derivados principalmente de bactérias ruminais, podendo também, em pequenas quantidades, serem oriundos do alongamento de propionato ou valerato da síntese *de novo* na glândula mamária (Keeney et al., 1962; Massart-Leën et al., 1983; Fievez et al., 2012). Dentre estes, a variação microbiana causada pela composição da dieta é considerada o principal fator que influencia o AGCIR do leite (French et al., 2012).

No presente estudo, a presença de APA ou MON reduziu a abundância de *R. albus* (*Firmicutes*), *S. bovis* (*Firmicutes*) e *F. succinogenes* (*Ficrobacteres*), e de CA reduziu a população de *P. ruminicola* (Bacteroidetes), *M. elsdenii* (*Firmicutes*) e *R. amylophilus* (*Proteobacteria*), que são fundamentais na síntese de AGCIR (Fievez et al., 2012), além de reduzir a síntese *de novo*, o que resultou na redução de AG de cadeia curta, média e, conseqüentemente, de cadeia ímpar e ramificada abaixo de C16 (Pierce et al., 2024). Vale ressaltar que os AGCIR estão relacionados à promoção de saúde humana, como atividade antitumoral em células humanas de câncer de mama, efeitos antiinflamatórios em enterócitos intestinais humanos e menor risco de desenvolvimento de esclerose múltipla (Holman et al., 1989; Wongtangtintharn et al., 2004; Ran-Ressler et al., 2011; Yan et al., 2018).

De forma geral, bactérias celulolíticas apresentam altas quantidades de ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR) em suas composições (Vlaeminck et al., 2006). No presente estudo, as dietas suplementadas com APA ou MON, independente da presença do CA, reduziram a abundância relativa de *R. albus*. Esta espécie celulolítica, Gram-positiva, é caracterizada por conter altas concentrações de ácidos graxos pares *iso* (C14:0 e C16:0) em sua composição (Vlaeminck et al., 2006). Apesar do efeito inibitório evidente de MON e APA sobre *R. albus*, não foi verificada influência dos aditivos sobre as concentrações de C14:0 e C16:0 no leite (Tabela 7), o que pode ser devido esses ácidos graxos serem dependentes da síntese *de novo* na glândula mamária.

Da mesma forma, *B. fibrisolvens*, espécie produtora de butirato, não foi influenciada pelos aditivos, com exceção da dieta APA+CA, que apresentou maior abundância relativa, possivelmente devido à presença do CA na dieta. Em contrapartida, a abundância relativa de *E. ruminantium* também não foi influenciada pelos aditivos alimentares, mas apresentou aumento quando associados com o CA. Esta espécie está relacionada diretamente com a presença do ácido tridecanóico (C13:0) no leite (Liu et al., 2019). No entanto, apesar do aumento da abundância relativa de *E. ruminantium* nas dietas com CA, não foi observada influência nas concentrações de C13:0 no leite (Tabela 9).

B. fibrisolvens e *E. ruminantium* (*Firmicutes*) são membros predominantes em lipólise, produção de ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) e redução deste a ácido esteárico (Karnati et al., 2009) e o aumento relativo desses membros indicam maior presença de C18:0 no leite, consistente com os resultados observados nas dietas com CA + APA e CA + MON.

E. ruminantium foi favorecida na presença de CA, *R. albus* foi inibida pelos aditivos (APA e MON) e *R. amylophilus* foi abundante na presença de APA e são importantes espécies produtoras de acetato, que está diretamente relacionado com a presença de ácidos graxos de cadeia curta e média no leite (Lor et al., 2016; Liu et al., 2019). Consistentemente, observou-se maior conteúdo desses ácidos graxos nas dietas sem CA com APA ou MON.

S. bovis apresentou redução da abundância relativa nas dietas suplementadas com APA ou MON. Esta redução é desejável devido *S. bovis* ser uma espécie diretamente relacionada com o início de acidose ruminal ao produzir lactato como principal produto da fermentação sob condições de baixo pH, o que impacta

negativamente na produção de leite e qualidade da gordura do leite (Abdela, 2016; Kim et al., 2021). Entretanto, se *M. elsdenii* for estimulada, consistente com resultados obtidos no presente estudo em dietas suplementadas com APA ou MON, poderá contribuir com a recuperação do pH ruminal por metabolizar ácido láctico e alterar a composição de ácidos orgânicos para butirato e propionato (Chen et al., 2019).

A indução de acidose subaguda resultou em abundância aumentada de *Firmicutes* (Plaizier et al., 2017) e decréscimo de abundância de *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* (Mao et al., 2013). No entanto, Jami et al. (2014), comparando microbiota ruminal entre vacas recebendo a mesma dieta com 70% de concentrado, reportaram que a razão *Firmicutes*:*Bacteroidetes* é positivamente correlacionada com produtividade da gordura do leite.

A abundância de uma determinada espécie e a baixa diversidade de espécies tem sido relatada em vacas com acidose ruminal subaguda e associada com menor adaptabilidade, funcionalidade e robustez da microbiota (Plaizier et al., 2017). Por outro lado, recentemente, muitos estudos relataram fortes correlações entre a eficiência alimentar e os perfis microbianos do rúmen. Por exemplo, alguns micróbios ruminais, seus genes e vias relacionadas estão intimamente ligados à eficiência alimentar em vacas leiteiras (Li, 2017; Paz et al., 2018).

Um estudo mostrou que, sob certas condições, um menos sofisticado, mas microbioma ruminal mais especializado de vacas leiteiras foi capaz de atender as necessidades energéticas do hospedeiro (Shabat et al., 2016). Além disso, uma análise de genes e espécies do microbioma poderia prever com precisão o fenótipo de eficiência alimentar do hospedeiro (Shabat et al., 2016).

Megasphaera elsdenii e os seus genes foram enriquecidos em certos microbiomas, resultando numa elevada disponibilidade de energia para o hospedeiro. Além disso, a via metabólica do acrilato também foi enriquecida em vacas de alta eficiência, mas as *Archaea* metanogênicas e a via da metanogênese eram menos prevalentes (Shabat et al., 2016). Os resultados do presente estudo mostraram que *M. elsdenii* foi o membro *Firmicutes* mais prevalente nas dietas com APA ou MON, sendo que o CA se associou com MON reduzindo a população desta espécie.

Também foi verificada redução da abundância relativa de *F. succinogenes* (*Fibrobacteres*) nas dietas suplementadas com MON e APA. A presença de fontes ricas em ácidos graxos insaturados na dieta, como o CA, pode inibir o crescimento de bactérias celulolíticas e reduzir a metanogênese (Zhang et al., 2008), como observado

no presente estudo. Da mesma forma, a monensina também é capaz de inibir a população de *F. succinogenes* e metanogênicos, como mostrado no presente estudo e relatado por Witzig et al. (2018), assim como APA em menor intensidade.

MON e APA aumentaram a abundância relativa de *P. ruminicola* (*Bacteroidetes*), que reduziu quando associados ao CA. Essa bactéria Gram-negativa influencia positivamente a produção de gordura do leite (Si et al., 2023) e conseqüentemente, o aumento na concentração de ácidos graxos do leite, devido à alta correlação com a produção de acetato, principal substrato para a síntese de gordura (Xue et al., 2020; Liu et al., 2022). Vale ressaltar que as dietas utilizadas possuíam palma, que apresenta alto teor de pectina, e assim, nestas condições, *P. ruminicola* é capaz de produzir mais acetato (Marounek e Dušková, 1999).

APA aumentou a abundância relativa da espécie amilolítica *R. amylophilus*, mas assim como as demais dietas suplementadas, aumentou a AbR de *S. ruminantium*. Ambas as espécies são influenciadas positivamente quando a dieta é composta em sua maioria por concentrado e são as principais produtoras de propionato a partir de succinato (Fernando et al., 2010), juntamente com *M. elsdenii*. No entanto, apresentaram respostas diferentes aos aditivos APA ou MON, quando associados ao CA. *S. ruminantium* é uma espécie importante que utiliza o lactato para a produção de propionato pela via do succinato (Wang et al., 2012). A redução da AbR desta espécie no rúmen é a principal causa de hipoglicemia e resulta no acúmulo de lactato livre, o que gera caso de cetose (Wang et al., 2012).

As concentrações dos ácidos linoleicos conjugados (CLA) C18:2 *cis*-9, *trans*-11 e C18:2 *trans*-10, *cis*-12 não foram afetadas ($P>0,05$) pelas dietas experimentais (Tabela 10).

Tabela 10. Composição dos ácidos graxos linoleicos conjugados (CLA) do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Ácidos graxos ¹	Dietas					EPM ²	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
C18:2 cis 9, trans-11	0,45	0,37	0,47	0,41	0,43	0,0204	0,1603
C18:2 trans-10, cis-12	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,0011	0,1572
C18:2 trans-10, cis-12/cis-9, trans-11	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,0017	0,7953

¹Nomeclatura usual expresso em g/100 g de gordura; ²Erro padrão da média.

Apesar da alta concentração de ácidos graxos C18 no CA, as concentrações de CLA no leite não foram influenciadas pelas dietas experimentais. Da mesma forma, Sullivan et al. (2004) e Sun et al. (2022) não identificaram diferença significativa nas concentrações de CLA do leite, entre a dieta contendo CA e a Controle (sem CA).

Os CLA são os primeiros intermediários de uma série de reações que afetam o ácido linoleico, tendo como produto final o ácido esteárico. A primeira reação é uma isomerização do ácido linoleico, em que uma das ligações duplas é deslocada e a sua configuração geométrica é alterada de *cis* para *trans*. Normalmente, esta isomerização afeta a dupla ligação Δ^{12} , dando origem ao CLA *cis*-9, *trans*-11. A *B. fibrisolvens* é uma das bactérias biohidrogenadoras do rúmen mais conhecidas. Isomerizam o ácido linoleico para obter principalmente CLA *cis*-9, *trans*-11 e reduzem-no a C18:1 *trans*-11.

Bactérias de biohidrogenação isomerizam via *trans*-11 ou *trans*-10, que significa que a alteração *trans*-10 está relacionada a mudanças de abundâncias ou atividades destas bactérias (Enjalbert et al., 2023) e a depressão da gordura do leite é uma mudança da biohidrogenação do ácido linoleico C18:2 *cis*-9, *cis*-12 para uma via *trans*-10, com um intermediário chave C18:2 *trans*-10, *cis*-12. Este isômero é forte inibidor da lipogênese na glândula mamária. A mudança de biohidrogenação *trans*-10 é ligada a uma dieta rica em amido e AG insaturados e está associada com mudança na comunidade microbiana. Entretanto, alto amido e alta gordura pode induzir alteração da microbiota sem alteração *trans*-10, que torna difícil explicar que mudanças são específicas às alterações *trans*-10 na depressão de gordura do leite.

No entanto, Jami et al. (2014), comparando microbiota ruminal entre vacas recebendo a mesma dieta com 70% de concentrado, reportaram que a razão *Firmicutes:Bacteroidetes* é positivamente correlacionada com produtividade da gordura do leite. No presente estudo, foi verificado que tanto CA quanto APA ou MON ao

provocarem alterações na população Firmicutes do rúmen não refletiu em mudança do conteúdo de C18:2 *trans*-10, *cis*-12 do leite.

Em condições de depressão da gordura do leite associadas ao deslocamento da biohidrogenação para *trans*-10, a isomerização afeta principalmente a ligação dupla Δ^9 , conduzindo a CLA *trans*-10, *cis*-12, mas os microrganismos envolvidos são ainda controversos (Enjalbert et al., 2023).

As espécies de bactérias ruminais analisadas neste estudo, apresentaram correlações com AG presentes do leite. As correlações existentes, positivas ou negativas, estão expressas na Tabela 11. A espécie *S. bovis* apresentou correlação positiva de intensidade média com a presença de ácidos graxos de cadeia curta e de cadeia ímpar, como o C4:0 (40,69%) e o C15:1 (46,46%), respectivamente, além dos ácidos graxos insaturados C18:3n6 (44,54%), C22:1n9 (45,08%), C20:3n3 (51,85%) e C22:2 (42,69%), e de cadeia longa, como o C24:0 (43,69%). *S. bovis* apresentou correlação negativa de intensidade média com a presença de C20:0 (-41,38%) e de C21:0 (-49,69%).

A espécie *R. amylophilus* apresentou correlação positiva de intensidade média com a presença de C15:1 (54,54%), C18:3n6 (48,38%), C22:1n9 (48,61%), C22:2 (39,85%) e C24:0 (60,15%). Em contrapartida, apresentou correlação negativa de intensidade média com C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (-40,92%), C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (-36,08%) e C21:0 (63,08%). *R. albus* também apresentou correlação positiva de intensidade média com C15:1 (54,46%), C22:1n9 (44,38%) e C24:0 (44%), e correlação negativa de intensidade média com C20:0 (-49,69%) e C21:0 (-60,77%).

Das espécies estudadas, apenas a *B. fibrisolvens* apresentou correlação positiva de intensidade média (Tabela 11) com a presença de C16:0 (56,23%) e correlação negativa de intensidade média com C18:0 (-40,23%). *S. ruminantium* apresentou correlação positiva de intensidade média com C4:0 (47,92%) e de outros ácidos graxos não relatados neste estudo (41,54%). Em contrapartida, *M. elsdenii* apresentou correlação negativa de intensidade média para os mesmos AG (-51,69 e -44,08%, respectivamente).

Tabela 11. Coeficientes de correlação de Spearman entre as espécies de bactérias ruminais e ácidos graxos do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Variável	<i>M.</i> <i>Elsdenii</i>	<i>S.</i> <i>ruminantium</i>	<i>S.</i> <i>Bovis</i>	<i>R.</i> <i>amylophilus</i>	<i>R.</i> <i>Albus</i>	<i>B.</i> <i>fibrisolvens</i>
C4:0	-0,5169**	0,4792***	0,4069***			
C15:1			0,4646***	0,5454**	0,5446**	
C16:0						0,5623**
C18:0						-0,4023***
C20:0			-0,4138***		-0,4969***	
C18:3n6			0,4454***	0,4838***		
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11				-0,4104***		
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12				-0,3608***		
C21:0			-0,4969***	-0,6308*	-0,6077**	
C22:1n9			0,4508***	0,4861***	0,4438***	
C20:3n3			0,5185**			
C22:2			0,4269***	0,3985***		
C24:0			0,4369***	0,6015**	0,4400***	
Outros	-0,4408****	0,4154****				

Significativo * (P<0,0001); ** (P<0,001); *** (P<0,01); **** (P<0,05).

Dentre as espécies bacterianas estudadas neste trabalho, a *S. bovis* apresentou mais correlações com os ácidos graxos do leite, seguido da *R. amylophilus*. Ambas as espécies, amilolíticas, apresentaram correlação positiva de intensidade média com o ácido graxo de cadeia ímpar C15:1 e os ácidos graxos de cadeia longa C18:3n6, C22:1n9, C22:2 e C24:0, o que reforça a relação destas espécies bacterianas com o perfil de ácidos graxos insaturados no leite. *S. bovis* apresentou ainda correlação positiva de intensidade média com C4:0, oriundo da síntese *de novo* e C20:3n3. Destas correlações, apenas o C15:1 é de origem microbiana, os demais são de origem dietética. De acordo com Fievez et al. (2012), esse resultado é devido às bactérias amilolíticas serem ricas em ácidos graxos lineares de cadeia ímpar e/ou de cadeia ramificada.

Por outro lado, *S. bovis* apresentou correlação negativa de intensidade média com C20:0 e C21:0, assim como *R. amylophilus* apresentou correlação negativa de intensidade média também com C21:0 e com os CLAs. C20:0 e C21:0 são ácidos graxos saturados e suas presenças no leite são dependentes da biohidrogenação microbiana ruminal dos ácidos graxos da forragem (Xu et al., 2015), de forma a explicar a correlação negativa com bactérias amilolíticas. Já os CLAs são intermediários da biohidrogenação ruminal, assim, com o aumento da população de *R. amylophilus* e conseqüentemente, aumento da biohidrogenação, resultam em menos isômeros intermediários.

Assim como *S. bovis* e *R. amylophilus*, *R. albus* apresentou correlação positiva de intensidade média com C15:1, C22:1n9 e C24:0, e correlação negativa de intensidade média com os ácidos graxos saturados C20:0 e C21:0. No entanto, diferente das citadas, *R. albus* é uma espécie fibrolítica. De acordo com Xu et al. (2015) e Xin et al. (2021), a espécie *R. albus* apresenta grande quantidade de ácidos graxos de cadeia ímpar (de 11C a 15C) e influencia diretamente o teor de ácidos graxos de cadeia longa no leite, que são dependentes da ação de bactérias fibrolíticas no rúmen. Entretanto, a correlação negativa com C20:0 e C21:0 se deu pelas diferenças entre as composições das dietas.

B. fibrisolvens apresentou correlação positiva de intensidade média com o ácido palmítico (C16:0) e negativa de intensidade média com o esteárico (C18:0). A presença de C16:0 no leite é mais evidente em animais alimentados com maior teor de forragem em comparação ao concentrado (Zhang et al., 2016), o que pode explicar a correlação positiva com *B. fibrisolvens*, espécie fibrolítica. A correlação negativa com C18:0 provavelmente é devido a *B. fibrisolvens* ser uma espécie importante na formação de

intermediários da biohidrogenação ruminal, como C18:1 *trans*-11 e CLAs (Amin e Mao, 2021), o que reduz a formação de C18:0, produto final da biohidrogenação.

A espécie *M. elsdenii* apresentou correlação negativa de intensidade média com C4:0 no leite. Tal correlação pode ser explicada pelo fato da *M. elsdenii* ser uma espécie amilolítica, fundamental na síntese de produtos intermediários da biohidrogenação, principalmente C18:2 *trans*-10 *cis*-12 CLA, e conseqüentemente, dependente da quantidade de concentrado na dieta (Kim et al., 2002). Já a presença de C4:0 no leite é dependente da síntese *de novo*, que está diretamente relacionada com o aumento da digestibilidade da fibra e da produção de acetato no rúmen (Liu et al., 2018).

Dentre os Filos, para *Firmicutes*, a abundância relativa não foi significativa com os grupos para as três classes (baixa, média e alta) de razão *trans*-10/*trans*-11 (Enjalbert et al., 2023), consistente com a ausência de correlação entre as bactérias do Filo *Firmicutes* avaliadas no presente estudo. Porém, enquanto Enjalbert et al. (2023) reportaram aumento na abundância relativa de uma cepa de *E. ruminantium* no seu grupo de afiliação para alta razão *trans*-10/*trans*-11, observamos ausência de correlação desta espécie para CLA *trans*-10, *cis*-12 no presente estudo. Da mesma forma, Devillard et al. (2007) observaram que cepa de *E. ruminantium* metabolizou ácido linoleico, mas a produção de ácido graxo *trans*-10 não foi reportada, contrastando com a correlação positiva entre a abundância desta espécie com a razão *trans*-10/*trans*-11 por Enjalbert et al. (2023).

Enjalbert et al. (2023) reportaram ainda que um grupo de *Ruminococcus* e membros da família *Succinovibrionaceae*, em que pertence a espécie *R. amylophilus* não tem sido ser positivamente ligada com a biohidrogenação via *trans*-10. Consistente com o resultado do presente estudo em que houve divergência entre *R. amylophilus* e CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite.

Dietas de alto grão/alto lipídeo para vacas aumentam a abundância de *M. elsdenii* (Pitta et al., 2020; Plaizier et al., 2017), mas não necessariamente causaram biohidrogenação para *trans*-10 (Enjalbert et al., 2023). Pitta et al. (2020) reportaram coeficiente de correlação de 0,70; 0,70; -0,70, respectivamente, entre *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Fibrobacter succinogenes* e a porcentagem de C18:1 *trans*-10 no leite. Já Rico et al. (2015) encontraram coeficiente de correlação de 0,30; 0,50; -0,70; -0,30, respectivamente, entre *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Ruminococcus* e a porcentagem de C18:1 *trans*-10 no leite. No presente estudo, CLA *trans*-10, *cis*-12 apenas apresentou moderada correlação negativa com *R. amylophilus*.

Enjalbert et al. (2017) levantaram a hipótese que a mudança de biohidrogenação *trans*-10 poderia ser devida a uma menor capacidade das bactérias ruminais de isomerizar ácido linoleico quando são inibidas pela adição de amido, óleo ou aditivo. Isso é consistente com o presente estudo que mostrou uma correlação negativa entre *R. amylophilus* e C18:2 *trans*-10, *cis*-12. No entanto, outros mostraram uma ligação positiva entre as abundâncias de *Firmicutes* e os isômeros *trans*-10 (Enjalbert et al., 2023). Esta falta de consistência pode refletir uma falta de relação entre a abundância e a atividade, especialmente para a biohidrogenação, que é um processo de desintoxicação e não um processo nutricional. A abundância de bactérias biohidrogenadoras está provavelmente mais fortemente ligada à sua capacidade de crescer num substrato de carboidratos do que à sua capacidade de hidrogenar AG insaturados (Enjalbert et al., 2017).

As dietas APA e MON apresentaram as maiores médias ($P < 0,05$) para os somatórios de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC; $P = 0,0002$) e de cadeia média (AGCM; $P < 0,0001$) do leite (Tabela 12), assim como para o somatório de AGS ($P < 0,0001$), índice de aterogenicidade (IA; $P < 0,0001$) e índice de trombogenicidade (IT; $P = 0,0030$). A dieta MON apresentou ainda, maiores médias para os somatórios de ácidos graxos com configuração *iso* ($P = 0,0415$) e *anteiso* ($P = 0,0346$), ímpares lineares ($P = 0,0084$) e AGCIR ($P = 0,0123$).

As dietas contendo CA apresentaram maiores médias ($P < 0,05$) para o somatório de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL; $P < 0,0001$), ácidos graxos insaturados (AGI; $P < 0,0001$) e AGMI ($P < 0,0001$), assim como para o total de AG com configuração *trans* ($P = 0,0162$), somatório de AG *cis*-9 ($P < 0,0001$), relação entre ômega 6 e ômega 3 ($P < 0,0001$), relação entre AGI e AGS ($P < 0,0001$), e a relação entre AG hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos ($P < 0,0001$) (Tabela 12). Entretanto, apresentaram menores média para os somatórios de ácidos graxos com configuração *iso* e *anteiso*, ímpares lineares e AGCIR.

Tabela 12. Valores médios relativos aos somatórios de ácidos graxos do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Ácidos graxos ¹	Dietas					EPM ²	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
Cadeia curta ³	7,95 ^{ab}	8,72 ^a	6,86 ^{bc}	8,15 ^a	6,49 ^c	0,2703	0,0002
Cadeia média ⁴	55,10 ^a	55,90 ^a	48,30 ^b	55,85 ^a	48,61 ^b	0,9139	<0,0001
Cadeia longa ⁵	33,01 ^b	31,68 ^b	41,34 ^a	32,27 ^b	41,64 ^a	1,0379	<0,0001
Saturados	75,65 ^a	77,28 ^a	72,15 ^b	76,02 ^a	72,85 ^b	0,7528	<0,0001
Insaturados	24,35 ^b	22,71 ^b	27,85 ^a	23,98 ^b	27,15 ^a	0,7528	<0,0001
Monoinsaturados	22,23 ^b	20,83 ^b	25,65 ^a	21,91 ^b	25,01 ^a	0,7028	<0,0001
Poli-insaturados	2,12	1,88	2,20	2,06	2,14	0,0706	0,2433
Trans total	1,85 ^{ab}	1,56 ^b	2,02 ^a	1,72 ^{ab}	2,02 ^a	0,0748	0,0162
∑ cis-9 ⁶	21,47 ^b	20,16 ^b	24,84 ^a	21,21 ^b	24,11 ^a	0,7343	<0,0001
Ômega 6	0,45	0,46	0,51	0,48	0,53	0,0109	0,0502
Ômega 3	0,16	0,15	0,13	0,17	0,14	0,0055	0,1073
Ômega 6 / Ômega 3 ⁷	2,90 ^b	3,07 ^b	3,78 ^a	2,80 ^b	3,65 ^a	0,1002	<0,0001
AGI / AGS ⁸	0,32 ^b	0,29 ^b	0,39 ^a	0,32 ^b	0,37 ^a	0,0135	<0,0001
AGPI / AGS ⁹	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,0012	0,0826
∑ anteiso ¹⁰	0,84 ^{ab}	0,79 ^{ab}	0,68 ^b	0,88 ^a	0,74 ^{ab}	0,0240	0,0346
∑ iso ¹¹	0,54 ^{ab}	0,49 ^{ab}	0,43 ^b	0,56 ^a	0,48 ^{ab}	0,0171	0,0415
∑ ímpares lineares ¹²	2,51 ^{ab}	2,54 ^{ab}	2,04 ^b	2,64 ^a	2,05 ^b	0,0684	0,0084
∑ AGCIR ¹³	3,89 ^{ab}	3,82 ^{ab}	3,16 ^b	4,08 ^a	3,28 ^{ab}	0,0993	0,0123
OUTROS	4,29	3,88	3,70	3,72	3,43	0,1441	0,2504
IA ¹⁴	4,07 ^a	4,50 ^a	3,11 ^b	4,24 ^a	3,08 ^b	0,1812	<0,0001
IT ¹⁵	4,92 ^{abc}	5,21 ^a	4,28 ^c	4,93 ^{ab}	4,41 ^{bc}	0,1747	0,0030
HH ¹⁶	0,40 ^b	0,37 ^b	0,54 ^a	0,39 ^b	0,53 ^a	0,0208	<0,0001

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05); ¹Nomeclatura usual expresso em g/100 g de gordura; ²Erro padrão da média; ³Ácidos graxos com 4 a 10 carbonos; ⁴Ácidos graxos com 11 a 17 carbonos; ⁵Ácidos graxos com 18 carbonos ou mais; ⁶Somatório de ácidos graxos com conjugação cis-9; ⁷Relação entre ômega 6 e ômega 3; ⁸Relação entre ácidos graxos insaturados e saturados; ⁹Razão entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados; ¹⁰∑ anteiso = C15:0 anteiso + C17:0 anteiso; ¹¹∑ iso = C15:0 iso + C16:0 iso + C17:0 iso; ¹²∑ ímpares lineares = C11:0 + C13:0 + C15:0 + C15:1 cis-9 + C17:0 + C17 cis-9 + C21:0 + C23:0; ¹³∑ AGCIR = ∑ anteiso + ∑ iso + ∑ ímpares lineares; ¹⁴Índice de aterogenicidade; ¹⁵Índice de trombogenicidade; ¹⁶Relação entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos.

De forma geral, os aditivos APA e MON influenciaram apenas os AGCC (≤ 10C) no leite. Os demais somatórios foram influenciados pela presença ou não do CA nas dietas. Foi observada redução nas concentrações de ácidos graxos provenientes da síntese *de novo* (< C16) e saturados, e aumento das concentrações de AGCL, insaturados e monoinsaturados no leite, nas dietas contendo CA. A redução nas concentrações de AGS no leite, principalmente C12:0 e C14:0 é de importância, pois consiste nos principais ácidos graxos aterogênicos (Ulbricht e Southgate, 1991). A adição de CA às dietas reduziu o índice de aterogenicidade em cerca de 24%, o que promove um leite mais saudável, uma vez que AG aterogênicos estão relacionados com

maior predisposição a doenças cardiovasculares em humanos (Chardigny et al., 2008; Wales et al., 2009).

O aumento na concentração de AGCL no leite observado nas dietas com CA se deu pelo maior fluxo de ácidos graxos C18 presentes do CA para a glândula mamária, e de seus isômeros oriundos da atividade microbiana no rúmen.

Os totais de ácidos graxos mono (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) foram maiores nas dietas com CA devido a elevação nas concentrações de C18:1 e C18:2n6, respectivamente, assim como as concentrações de *trans* total e somatório de *cis*-9, que se deu por conta da quantidade de ácidos graxos passíveis de isomerização no rúmen e resultou em aumento nas concentrações de C18:1 *trans*-9 e C18:1 *cis*-9. A relação de ω -6 / ω -3 também foi influenciada devido ao aumento da concentração de C18:2n6, nas dietas contendo CA.

A razão entre AGS e AGI reduziu nas dietas com CA, devido a inibição na síntese *de novo* dos ácidos graxos C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 e C15:0, e, em adição, aumento de C18:1 e C18:2.

Foi observado aumento nas concentrações de ácidos graxos *anteiso*, *iso* ímpares lineares e AGCIR na dieta MON. Tal efeito da monensina sobre esses ácidos graxos foi relatado por Henno et al. (2021), que observaram aumento principalmente nas concentrações de C15:0, C15:0 *iso* e C15:0 *anteiso* no leite, quando os animais foram suplementados com monensina.

Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) foram menores nas dietas com CA, o que indica melhor qualidade da gordura do leite, quando comparada com as demais. Da mesma forma, a razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) no leite foi maior nas dietas com CA devido à redução de ácidos graxos que promovem aumento do colesterol em humanos (hipercolesterolemia), como o C12:0 e C14:0 e aumento de ácidos graxos insaturados, que reduzem os índices de colesterol na corrente sanguínea (Lima et al., 2000).

De maneira geral, a inclusão de CA às dietas resultou em alterações desejáveis no perfil de ácidos graxos do leite, em que proporcionou a redução de ácidos graxos indesejáveis como C12:0 e C14:0, que estão relacionados com a incidência de doenças cardiovasculares em humanos, e promoveu o aumento de ácidos graxos de interesse, como o C18:1 *cis*-9, que está relacionado com a redução de LDL no sangue em humanos, enquanto aumenta os níveis de HDL, além de combater o câncer de mama e aliviar sintomas de asma (Peri, 2014), e C18:1 *trans*-9, que é precursor de CLA com

características antiobesidade e anticarcinogênico (E Silva et al., 2020). Por outro lado, Abbey e Nestel (1994) reportaram que o ácido elaídico aumenta a atividade da proteína de transferência de ésteres de coleteroil (CETP), que por sua vez aumenta a quantidade de colesterol VLDL e diminui o colesterol HDL, o que pode promover a aterosclerose.

A atividade da enzima Δ^9 -dessaturase não foi afetada ($P>0,05$) com exceção sobre o ácido graxo C18 (Tabela 13), em que foi observada menor atividade ($P<0,0001$) nas dietas que continham CA. As dietas com aditivos e sem CA apresentaram médias maiores do que as dietas com CA para a atividade da enzima Δ^9 -dessaturase, no entanto, APA foi inferior ao controle. APA reduziu o conteúdo de ácido elaídico que pode ter contribuído com este resultado.

Tabela 13. Atividade da enzima Δ^9 -dessaturase nos ácidos graxos do leite de vacas em lactação alimentadas com dietas contendo ou não caroço de algodão (CA), suplementadas com APA ou MON

Ácidos graxos ¹	Dietas					EPM ²	P-value
	Controle	APA	APA+CA	MON	MON+CA		
C14	0,09	0,09	0,08	0,09	0,08	0,0050	0,1512
C16	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,0022	0,3625
C18	0,68 ^a	0,65 ^{bc}	0,63 ^{cd}	0,67 ^{ab}	0,61 ^d	0,0128	<0,0001

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$);

¹Nomeclatura usual expresso em g/100 g de gordura.

Foi observada redução na atividade da enzima Δ^9 -dessaturase nas dietas suplementadas com APA ou MON, principalmente nas dietas que continham CA. Esse efeito se dá pela presença de ácidos graxos ciclopropenóicos presentes no CA, com destaque para o ácido estercúlico (*cis*-9,10-metileno-9-ocdecenóico) que é inibidor da enzima Δ^9 -dessaturase (Kadegowda et al., 2013; Ortinau et al., 2013). Além disso, de acordo com Rennó et al. (2013), esse efeito se dá ainda por conta da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos oriundos de fontes adicionais de lipídios, como o CA, o que causa redução da atividade da enzima Δ^9 -dessaturase e conseqüentemente, a concentração de gordura no leite de vacas. Esse efeito fisiológico é corroborado com a ausência de alteração no perfil de CLAs no leite, que são originários principalmente pela atividade da enzima Δ^9 -dessaturase (Corl et al., 2001; Piperova et al., 2002).

4 – CONCLUSÕES

A suplementação com MON reduz o consumo de FDNcp e aumenta a digestibilidade da MS e FDNcp e APA não afeta o consumo de FDNcp, mas reduz a digestibilidade da FDNcp, possivelmente, devido à inibição de *R. albus* e *F. succinogenes*. Além disso, APA sem CA reduz ainda mais a digestibilidade de FDNcp ao afetar a população de *B. fibrisolvens*.

Dietas contendo CA e/ou suplementadas com APA aumentam o consumo de EE em vacas lactantes. O CA aumenta ainda o consumo de ácidos graxos com 16 e 18 carbonos, não sendo influenciado pelo uso de aditivos, e aumenta a digestibilidade de ácidos graxos com 16 carbonos em vacas lactantes.

O CA aumenta a biohidrogenação para ácido esteárico por favorecer atividade de *E. ruminantium*.

CA reduz a síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia curta a média abaixo de C16 na glândula mamária, aumenta a concentração de ácidos graxos de cadeia longa, insaturados, monoinsaturados, trans total e com configuração *cis*-9, e reduzem a atividade da enzima Δ^9 -dessaturase em ácidos graxos com 18 carbonos, sem influência dos aditivos.

O conteúdo de ácidos graxos de cadeia ímpar ramificada é afetado pelo CA por reduzir a abundância de bactérias *M. elsdenii*, *P. ruminicola* e *R. amylophilus*

APA aumenta os conteúdos de ácido capróico, ácido caprílico e reduz ácido elaídico no leite.

APA e MON aumentam as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta à média no leite.

As dietas com CA e suplementadas com APA ou MON não alteram o conteúdo de C18:2 *trans*-10, *cis*-12 CLA do leite.

R. amylophilus apresenta moderada correlação negativa com a biohidrogenação do ácido linoleico tanto por via *trans*-11 quanto *trans*-10.

Na presença de CA, APA aumenta a população de *B. fibrisolvens*, *E. ruminantium* e *M. elsdenii*.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBEY, M.; NESTEL, P.J. Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is increased when trans-elaidic acid is substituted for cis-oleic acid in the diet. **Atherosclerosis**, v.106, p.99-107, 1994.

ABDELA, N. Sub-acute Ruminant Acidosis (SARA) and its Consequence in Dairy Cattle: A Review of Past and Recent Research at Global Prospective. **Achievements in the Life Sciences**, v.10, p.187-196, 2016.

ACKMAN, R.G. The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, v.12, p.165-284, 1982.

AHVANOUEI, M.R.R.; NOROUZIAN, M.A.; PIRAY, A.H.; VAHMANI, P.; GHAFFARI, M.H. Effects of monensin supplementation on lactation performance of dairy cows: a systematic review and dose-response meta-analysis. **Scientific Reports**, v.13, 568, 2023.

ALMEIDA, M.M.; LUQUETTI, S.C.D.; SABARENSE, C.M.; CORRÊA, J.O.A.; REIS, L.G.; CONCEIÇÃO, E.P.S.; LISBOA, P.C.; MOURA, E.G.; GAMEIRO, J.; GAMA, M.A.S.; LOPES, F.C.F.; GONZÁLEZ-GARCIA, R.M. Butter naturally enriched in *cis*-9 *trans*-11 CLA prevents hyperinsulinemia and increases both serum HDL cholesterol and triacylglycerol levels in rats. **Lipids in Health and Disease**, v.13, p.1-13, 2014.

AMIN, A.B.; MAO, S. Influence of yeast on rumen fermentation, growth performance and quality of products in ruminants: A review. **Animal Nutrition**, v.7, p.31-41, 2021.

BARBER, M.C.; CLEGG, R.A.; TRAVERS, M.T.; VERNON, R.G. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1347, p.101-126, 1997.

BALES, A.M.; SANTOS NETO, J.M.; LOCK, A.L. Effect of increasing dietary inclusion of whole cottonseed on nutrient digestibility and milk production of high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.107, p.7798-7809, 2024.

BANNON, C.D.; CRASKE, J.D.; HAI, N.T.; HARPER, N.L.; O'ROURKE, K.L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. **Journal of Chromatography**, v.217, p.63-69, 1982.

BICHI, E.; TORAL, P.G.; HERVÁS, G.; FRUTOS, P.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; JUÁREZ, M.; FUENTE, M.A. Inhibition of Δ^9 -desaturase activity with sterculic acid: Effect on the endogenous synthesis of *cis*-9 18:1 and *cis*-9, *trans*-11 18:2 in dairy sheep. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5242-5252, 2012.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BUSETTI, M. The Quality of Sheep's Milk. **Boletín de Divulgación Técnica**, v.90, p.206-214, 2006.

CHARDIGNY, J.-M.; DESTAILLATS, F.; MALPUECH-BRUGÈRE, C.; MOULIN, J.; BAUMAN, D.E.; LOCK, A.L.; BARBANO, D.M.; MENSINK, R.P.; BEZELGUES, J.-B.; CHAUMONT, P.; COMBE, N.; CRISTIANI, I.; JOFFRE, F.; GERMAN, J.B.; DIONISI, F.; BOIRIE, Y.; SÉBÉDIO, J.-L. Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.87, p.558-566, 2008.

CHEN, L.; SHEN, Y.; WANG, C.; DING, L.; ZHAO, F.; WANG, M.; FU, J.; WANG, H. *Megasphaera elsdenii* Lactate Degradation Pattern Shifts in Rumen Acidosis Models. **Frontiers in Microbiology**, v.10, 162, 2019.

CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; GABORIT, P.; RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAURET, A.; LEROUX, C. **Optimising Goat's Milk and Cheese Fatty Acid Composition**. Amsterdam: Elsevier, 2006. p.281-312.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A. The role of Δ^9 -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.622-630, 2001.

COSTA, E.N.; FERRÃO, S.P.B.; SILVA, R.R.; PORTO JR, A.F.; DAMÁSIO, J.M.A.; SANTIAGO, B.M.; COSTA, E.G.L.; SILVA, F.F. Fatty Acid Profile and Milk Cholesterol of Crossbred Holstein x Zebu Cows Fed on Whole Cottonseed. **The Journal of Brazilian Chemical Society**, v.29, p.1770-1775, 2018.

DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos - INCT - Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 214p., 2012.

DEVILLARD, E.; MCINTOSH, F.M.; DUNCAN, S.H.; WALLACE, R.J. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.2566-2570, 2007.

E SILVA, L.S.; CAVALCANTI, J.V.F.L.; MAGALHÃES, A.L.R.; SANTORO, K.R.; GONÇALVES, G.D.; SANTANA, L.P.V.; SILVA, J.K.B.; ALMEIDA, O.C. Soybean oil modulates the fatty acid synthesis in the mammary gland improving nutritional quality of the goat milk. **Small Ruminant Research**, v.183, 106041, 2020.

EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D.; LEOPOLDINO, W.M.; ARCURI, P.B.; LEÃO, M.I.; COTA, M.R.; VALADARES FILHO, S.C. Milk fatty acid profile of cows fed monensin and soybean oil in early lactation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.219-228, 2006.

ENJALBERT, F.; COMBES, S.; ZENED, A.; MEYNADIER, A. Rumen microbiota and dietary fat: a mutual shaping. **Journal of Applied Microbiology**, v.123, p.782-797, 2017.

ENJALBERT, F.; ZENED, A.; CAUQUIL, L.; MEYNADIER, A. Integrating data from spontaneous and induced trans-10 shift of ruminal biohydrogenation reveals discriminant bacterial community changes at the OUT level. **Frontiers in Microbiology**, v.13, 1012341, 2023.

FELLNER, V.; SAUER, F.D.; KRAMER, J.K.G. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.921-928, 1997.

FERNANDES, M.F.; QUEIROGA, R.C.R.E.; MEDEIROS, A.N.; COSTA, R.G.; BOMFIM, M.A.D.; BRAGA, A.A. Physico-chemical characteristics and fatty acid profile of milk of crossbred Moxotó goats supplemented with cottonseed or sunflower oil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.703-710, 2008.

FERNANDO, S.C.; PURVIS, H.; NAJAR, F.; SUKHARNIKOV, L.; KREHBIEL, C.; NAGARAJA, T.; ROE, B.; DESILVA, U. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p.7482-7490, 2010.

FIEVEZ, V.; COLMAN, E.; CASTRO-MONTOYA, J.M.; STEFANOV, I.; VLAEMINCK, B. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function- An update. **Animal Feed Science and Technology**, v.172, p.51-65, 2012.

FRENCH, E.A.; BERTICS, S.J.; ARMENTANO, L.E. Rumen and milk odd- and branched-chain fatty acid proportions are minimally influenced by ruminal volatile fatty acid infusions. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.2015-2026, 2012.

GONDIM-TOMAZ, R.M.A.; ERISMANN, N.M.; CIA, E.; KONDO, J.I.; FUZATTO, M.G.; CARVALHO, C.R.L. Oil content and fatty acid composition of cottonseeds from different genotypes. **Brazilian Journal Food Technology**, v.19, e2015071, 2016.

HENNO, M.; LING, K.; KAART, T.; ARIKO, T.; KARIS, P.; JAAKSON, H.; KUUSIK, S.; OTS, M. Effect of monensin on milk fatty acid profile in dairy cows and on the use of fatty acids for early diagnosis of elevated blood plasma concentrations of nonesterified fatty acids and hyperketonemia. **Journal of Dairy Science**, v.104, p.10355-10362, 2021.

HOLMAN, R.T.; JOHNSON, S.B.; KOKMEN, E. Deficiencies of polyunsaturated fatty acids and replacement by nonessential fatty acids in plasma lipids in multiple sclerosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.86, p.4720-4724, 1989.

JAMI, E.; WHITE, B.A.; MIZRAHI, I. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. **PloS ONE**, v.9, e85423, 2014.

JENKINS, T.C.; FELLNER, V.; MCGUFFEY, R.K. Monensin by fat interactions on trans fatty acids in cultures of mixed ruminal microorganisms grown in continuous fermentors fed corn or barley. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.324-330, 2003.

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.; MOSLEY, E.E. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids with the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v.86, p.397-412, 2008.

KADEGOWDA, A.K.; BURNS, T.A.; PRATT, S.L.; DUCKETT, S.K. Inhibition of stearoyl-CoA desaturase 1 reduces lipogenesis in primary bovine adipocytes. **Lipids**, v.48, p.967–976, 2013.

KARNATI, S.K.R.; SILVESTRE, J.T.; RIBEIRO, C.V.D.M.; GILLIGAN, L.E.; FIRKINS, J.L. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. I. Fermentation, biohydrogenation, and microbial protein synthesis. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.3849-3860, 2009.

KEENEY, M.; KATZ, I.; ALLISON, M.J. On the probable origin of some milk fat acids in rumen microbial lipids. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.39, p.198-201, 1962.

KIM, H.; PARK, T.; KWON, I.; SEO, J. Specific inhibition of *Streptococcus Bovis* by Endolysin LyJH307 supplementation shifts the rumen microbiota and metabolic pathways related to carbohydrate metabolism. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.12, 93, 2021.

KIM, U.J.; LIU, R.H.; RYCHLIK, J.L. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.976-982, 2002.

LI, F. Metatranscriptomic profiling reveals linkages between the active rumen microbiome and feed efficiency in beef cattle. **Applied Environment Microbiology**, v.83, e00061-00017, 2017.

LIMA, F.E.L.; MENEZES, T.N.; TAVARES, M.P.; SZARFARC, S.C.; FISBERG, R.M. Fatty acids and cardiovascular diseases: a review. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.13, p.73-80, 2000.

LIU, K.; LI, Y.; LUO, G.; XIN, H.; ZHANG, Y.; LI, G. Relations of Ruminal Fermentation Parameters and Microbial Matters to Odd- and Branched-Chain Fatty Acids in Rumen Fluid of Dairy Cows at Different Milk Stages. **Animals**, v.9, 1019, 2019.

LIU, K.; ZHANG, Y.; HUANG, G.; ZHENG, N.; ZHAO, S.; WANG, J. Ruminal bacterial community is associated with the variations of total milk solid content in Holstein lactating cows. **Animal Nutrition**, v.9, p.175–183, 2022.

LIU, Q.; WANG, C.; GUO, G.; HUO, W.J.; ZHANG, S.L.; PEI, C.X.; ZHANG, Y.L.; WANG, H. Effects of branched-chain volatile fatty acids on lactation performance and mRNA expression of genes related to fatty acid synthesis in mammary gland of dairy cows. **Animal**, v.12, p.2071-2079, 2018.

LOOR, J. J., ELOLIMY, A. A., MCCANN, J. C. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production. **Animal Frontiers**, v.6, p.22-29, 2016.

MAKI, K.C.; DICKLIN, M.R.; KIRKPATRICK, C.F. Saturated fats and cardiovascular health: Current evidence and controversies. **Journal of Clinical Lipidology**, v.15, p.765-772, 2021.

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

MAO, S.Y.; ZHANG, R.Y.; WANG, D.S.; ZHU, W.-Y. Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. **Anaerobe**, v.24, p.12-19, 2013.

MAROUNEK, M.; DUŠKOVÁ, D. Metabolism of pectin in rumen bacteria *Butyrovibrio fibrisolvens* and *Prevotella ruminicola*. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p.429-433, 1999.

MARTIN, C.; MORGAVI, D.P.; DOREAU, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. **Animal**, v.4, p.351–365, 2010.

MASSART-LEËN, A.; ROETS, E.; PEETERS, G.; VERBEKE, R. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.1445-1454, 1983.

MOLLICA, M.P.; TRINCHESE, G.; CIMMINO, F.; PENNA, E.; CAVALIERE, G.; TUDISCO, R.; MUSCO, N.; MANCA, C.; CATAPANO, A.; MONDA, M.; BERGAMO, P.; BANNI, S.; INFASCELLI, F.; LOMBARDI, P.; CRISPINO, M. Milk Fatty Acid Profiles in Different Animal Species: Focus on the Potential Effect of Selected PUFAs on Metabolism and Brain Functions. **Nutrients**, v.13, 1111, 2021.

MUTSVANGWA, T.; KRAMER, J.K.G.; BLACKADAR, C.B.; DUFFIELD, T.F.; BAGG, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B.W. Short Communication: Effects of a Monensin Premix on Milk Fatty Acid Content During Subacute Ruminal Acidosis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.4043-4046, 2003.

ORTINAU, L.C.; NICKELSON, K.J.; STROMSDORFER, K.L.; NAIK, C.Y.; PICKERING, R.T.; HAYNES, R.A.; FRITSCHKE, K.L.; PERFIELD, J.W. Sterculic Oil, a natural inhibitor of SCD1, improves the metabolic state of obese OLETF rats. **Obesity**, v.21, p.344–352, 2013.

OSBORNE, J.K.; MUTSVANGWA, T.; ALZAHAL, O.; DUFFIELD, T.F.; BAGG, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B.W. Effects of Monensin on Ruminal Forage Degradability and Total Tract Diet Digestibility in Lactating Dairy Cows During Grain-Induced Subacute Ruminal Acidosis. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.1840-1847, 2004.

PAZ, H.A.; HALES, K.E.; WELLS, J.E.; KUEHN, L.A.; FREELY, H.C.; BERRY, E.D.; FLYTHE, M.D.; SPANGLER, M.L.; FERNANDO, S.C. Rumen bacterial community structure impacts feed efficiency in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.96, p.1045-1058, 2018.

PERI, C. **The extra-virgin olive oil handbook**. Claudio Peri (ed.), Nova Jersey: Wiley-Blackwell, 2014.

PIERCE, R.B.; ADENIJI, Y.A.; BOMBERGER, R.; GOODALL, S.R.; HARVATINE, K.J. Effect of feeding increasing levels of whole cottonseed on milk and milk components, milk fatty acid profile, and total-tract digestibility in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.107, p.2916-2929, 2024.

PIPEROVA, L. S., SAMPUGNA, J., TETER, B. B., KALSCHEUR, K. F., YURAWECZ, M. P., KU, Y., MOREHOUSE, K. M., ERDMAN, R. A. Duodenal and Milk Trans Octadecenoic Acid and Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers Indicate that Postabsorptive Synthesis Is the Predominant Source of cis-9-Containing CLA in Lactating Dairy Cows. **The Journal of Nutrition**, v.132, p.1235-1241, 2022.

PITTA, D.W.; INDUGU, N.; VECCHIARELLI, B.; HENNESSY, M.; BALDIN, M.; HARVATINE, K.J. Effect of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoate (HMTBa) supplementation on rumen bacterial populations in dairy cows when exposed to diets with risk for milk fat depression. **Journal Dairy Science**, v.103, p.2718-2730, 2020.

PLAIZIER, J.C.; LI, S.; TUN, H.M.; KHAFIPOUR, E. Nutritional models of experimentally-induced subacute ruminal acidosis (SARA) differ in their impact on rumen and hindgut bacterial communities in dairy cows. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 2128, 2017.

RAN-RESSLER, R.R.; KHAILOVA, L.; ARGANBRIGHT, K.M.; ADKINS-RIECK, C.K.; JOUNI, Z.E.; KOREN, O.; LEY, R.E.; BRENNAN, J.T.; DVORAK, B. Branched chain fatty acids reduce the incidence of necrotizing enterocolitis and alter gastrointestinal microbial ecology in a neonatal rat model. **PloS ONE**, v.6, e29032, 2011.

RENNÓ, F.P.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; GANDRA, J.R.; VERDURICO, L.C.; SANTOS, M.V.; BARLETTA, R.V.; VENTURELLI, B.C.; VILELA, F.G. Fatty acid profile and composition of milk protein fraction in dairy cows fed long-chain unsaturated fatty acids during the transition period. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, p.813-823, 2013.

REVENEAU, C. **Dietary source and availability of fatty acids to manipulate ruminal protozoa, metabolism of fat, and milk fatty acid profile in lactating dairy cows**. 2008. 152p. Tese (doutorado em nutrição) - Ohio State University.

RICO, D.E.; PRESTON, S.H.; RISSER, J.M.; HARVATINE, K.J. Rapid changes in key ruminal microbial populations during the induction of and recovery from diet-induced milk fat depression in dairy cows. **The British Journal of Nutrition**, v.14, p.358-367, 2015.

RICO, J.E.; SOUZA, J.; ALLEN, M.S.; LOCK, A.L. Nutrient digestibility and milk production responses to increasing levels of palmitic acid supplementation vary in cows receiving diets with or without whole cottonseed. **Journal of Animal Science**, v.95, p.436-446, 2017.

SANTOS-SILVA, J.; BESSA, R.J.B.; SANTOS-SILVA, F. Effect of genotype, feeding system and slaughter weight on the quality of light lambs: II. Fatty acid composition of meat. **Livestock Production Science**, v.77, p.187-194, 2002.

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

SENDRA, E. Dairy Fat and Cardiovascular Health. **Foods**, v.9, 838, 2020.

SHABAT, S.K.B.; SASSON, G.; DORON-FAIGENBOIM, A.; DURMAN, T.; YAACOBY, S.; MILLER, M.E.B.; WHITE, B.A.; SHTERZER, N.; MIZRAHI, I. Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. **The ISME Journal**, v.10, p.2958-2972, 2016.

SI, B.; LIU, K.; HUANG, G.; CHEN, M.; YANG, J.; WU, X.; LI, N.; TANG, W.; ZHAO, S.; ZHENG, N.; ZHANG, Y.; WANG, J. Relationship between rumen bacterial community and milk fat in dairy cows. **Frontiers in Microbiology**, v.14, 1247348, 2023.

SULLIVAN, H.M.; BERNARD, J.K.; AMOS, H.E.; JENKINS, T.C. Performance of Lactating Dairy Cows Fed Whole Cottonseed with Elevated Concentrations of Free Fatty Acids in the Oil. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.665-671, 2004.

SLUIJS, I.; FOROUHI, N.G.; BEULENS, J.W.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; AGNOLI, C.; ARRIOLA, L.; BALKAY, B.; BARRICARTE, A.; BOEING, H.; BUENO-DE-MESQUITA, H.B.; et al. The amount and type of dairy product intake and incident type 2 diabetes: Results from the epic-interact study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.96, p.382-390, 2012.

SUN, X.; SU, Y.; HAO, Y.; ZHANG, J.; YUE, X.; WANG, W.; MA, Z.; CHU, K.; WANG, S.; WANG, Y.; LI, S. Novel Process Methods for the Whole Cottonseed: Effect on the Digestibility, Productivity, Fat Profile, and Milk Gossypol Levels in Lactating Dairy Cows. **Frontiers in Nutrition**, v.9, 801712, 2022.

ULBRICHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. **Coronary heart disease: seven 2693 dietary factors**. The Lancet, v.338, p.85-92, 1991.

VAHMANI, P.; MEADUS, W.J.; DUFF, P.; ROLLAND, D.C.; DUGAN, M.E.R. Comparing the lipogenic and cholesterol genic effects of individual trans-18:1 isomers in liver cells. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.119, 1600162, 2017.

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

VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B. **Ácidos Graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, 2006.

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

WALES, W.J.; KOLVER, E.S.; EGAN, A.R.; ROCHE, R. Effects of strain of Holstein-Friesian and concentrate supplementation on the fatty acid composition of milk fat of dairy cows grazing pasture in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.247-255, 2009.

WANG, X.; LI, X.; ZHAO, C.; HU, P.; CHEN, H.; LIU, Z.; LIU, G.; WANG, Z. Correlation between Composition of the Bacterial Community and Concentration of Volatile Fatty Acids in the Rumen during the Transition Period and Ketosis in Dairy Cows. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, p.2386-2392, 2012.

WEIMER, P.J.; STEVENSON, D.M.; MERTENS, D.R.; THOMAS, E.E. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.80, p. 135-145, 2008.

WITZIG, M.; ZEDER, M.; RODEHUTSCORD, M. Effect of the ionophore monensin and tannin extracts supplemented to grass silage on populations of ruminal cellulolytics and methanogens *in vitro*. **Anaerobe**, v.50, p.44-54, 2018.

WONGTANGTINTHARN, S.; OKU, H.; IWASAKI, H.; TODA, T. Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. **Journal of Nutritional Science & Vitaminology**, v.50, p.137-143, 2004.

XIN, H.; KHAN, N. A.; LIU, X.; JIANG, X.; SUN, F.; ZHANG, S.; SUN, Y.; ZHANG, Y.; LI, X. Profiles of Odd- and Branched-Chain Fatty Acids and Their Correlations with Rumen Fermentation Parameters, Microbial Protein Synthesis, and Bacterial Populations Based on Pure Carbohydrate Incubation *in vitro*. **Frontiers in Nutrition**, v.8, 733352, 2021.

XU, T.; TAO, H.; CHANG, G.; ZHANG, K.; XU, L.; SHEN, X. Lipopolysaccharide derived from the rumen down-regulates stearyl-CoA desaturase 1 expression and alters fatty acid composition in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet. **BMC Veterinary Research**, v.11, 52, 2015.

XUE, M.Y.; SUN, H.Z.; WU, X.H.; LIU, J.X.; GUAN, L.L. Multi-omics reveals that the rumen microbiome and its metabolome together with the host metabolome contribute to individualized dairy cow performance. **Microbiome**, v.8, 64, 2020.

YAN, Y.Y.; WANG, Z.; WANG, D.H.; LAWRENCE, P.; WANG, X.G.; KOTHAPALLI, K.S.D.; GREENWALD, J.; LIU, R.J.; PARK, H.G.; BRENNAN, J.T. BCFA-enriched vernix-monoacylglycerol reduces LPS-induced inflammatory markers in human enterocytes *in vitro*. **Pediatric Research**, v.83, p.874-879, 2018.

ZHANG, C.M.; GUO, Y.Q.; YUAN, Z.P.; WU, Y.M.; WANG, J.K.; LIU, J.X.; ZHU, W.Y. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.146, p.259-269, 2008.

ZHANG, Y.; LIU, K.; HAO, X.; XIN, H. The relationships between odd- and branched-chain fatty acids to ruminal fermentation parameters and bacterial populations with different dietary ratios of forage and concentrate. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.101, p.1103-1114, 2016.