

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

PATRICIA BARBOZA DE GODOY

Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras

Piracicaba
2007

PATRICIA BARBOZA DE GODOY

Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura
Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Godoy, Patricia Barboza de

Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras / Patricia Barboza de Godoy; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - Piracicaba, 2007.

94 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Nutrição animal 2. Ruminantes 3. Taninos I. Título

CDU 591.53:633.31/37

DEDICATÓRIA

Ao Cassiano, meu esposo, que é a pessoa mais querida e compreensiva para estar ao meu lado me dando suporte para agüentar todas as lutas.

Aos meus pais, Lourival e Rosangela, e meus irmãos Rafael e Natália, pela dedicação na minha formação.

Aos meus avós, Israel e Flor de Liz, por me acolherem e me darem carinho no momento que eu mais precisei.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me fortalecer todos os dias da minha vida.

Ao Prof. Adibe Luiz Abdalla, pelo incentivo e orientação no trabalho.

À Profa. Dra. Dorinha M.S.S. Vitti Kennedy, pela orientação e apoio durante todo o meu estudo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por conceder-me a oportunidade da realização dos meus estudos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Prof. Edimilson J. Ambrosano, Apta Regional Pólo Centro Sul, pela orientação na escolhas das espécies das plantas e apoio durante as coletas.

Ao amigo Ives Cláudio da Silva Bueno, pela constante dedicação, força e amizade, e sempre presente durante todo o meu estudo.

Ao amigo Sérgio Lucio Salomon Cabral Filho, pelo auxílio na condução do experimento, pelo estímulo e amizade.

Aos amigos Alcester Mendes, Alessandro P. Minho, Ana Paula Roque, Eduardo F. Nozella, Lerner A. Oinedo, Priscila Brigide, Raquel S. D. Betini, Sarita P. Gobbo, Tanimara Soares, pelo auxílio, estímulo e amizade.

Aos funcionários Joaquim E. M. dos Santos, Lécio Ap. Castilho, Maria Regina S.R. Peçanha, Silvana P. Maziero, pela colaboração no trabalho e auxílio nos procedimentos analíticos realizados.

Aos estagiários Ana Lúcia da Silva, Bruna H. Lamo, Priscila N. Morato, Mariana Kikuchi, Matheus A.S.L. Moneco, Fernanda C. Campos, Jaqueline Mechi, Mariana Novello, Viviane C. Prieto, pela ajuda oferecida sempre que necessário.

Ao Rev Fabrício Breglia Bortoleto e aos Prs. Paulo Daniel Cella e João Roberto Basso Mangabeira, pelas constantes intercessões, orações e palavras de fé e estímulo, sempre que necessitei nessa caminhada.

"Posso todas as coisas Naquele que me fortalece"

Filipenses 4:13

RESUMO

GODOY, P.B. **Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras.** 2007. 94 f Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

As leguminosas constituem uma importante fonte de alimentos para os ruminantes e podem ser exploradas para pastejo direto ou, se conservadas, para fornecimento na forma de feno ou silagem. Algumas leguminosas possuem compostos fenólicos em sua composição. A caracterização química dessas plantas possibilita melhor uso das mesmas na alimentação animal assim como um melhor entendimento dos efeitos positivos e negativos dos compostos fenólicos na nutrição dos animais. Objetivou-se com o presente estudo: (i) avaliar a composição química de cinco leguminosas de interesse para a alimentação de ruminantes; (ii) estudar os efeitos dos taninos de diferentes leguminosas na produção de gases *in vitro*; e (iii) estudar os efeitos de dietas constituídas com estas leguminosas no consumo voluntário e digestibilidade aparente dos nutrientes em ovinos. O primeiro trabalho (Capítulo 3) refere-se à caracterização *in vitro* das leguminosas forrageiras (*Leucaena leucocephala* (Leucena), *Arachis pintoi* (Amendoim forrageiro), *Stylosanthes guianenses* cv mineirão (Estilosantes mineirão), *Stylosanthes guianenses* cv Campo Grande (Estilosantes Campo Grande) e *Calopogonio* sp. (Calopogônio). Foram avaliadas a composição química, a quantificação de taninos, a fermentabilidade ruminal e a síntese microbiana e os resultados obtidos demonstraram valores de proteína bruta compatíveis com a literatura, exceto para o Calopogônio e Estilosantes Campo Grande (< 60 g kg⁻¹ MS). Os teores de taninos variaram significativamente dentre as plantas estudadas, entretanto o teor de tanino condensado pode ser considerado seguro para os animais (entre 30 a 40 eq-g leucocianidina kg⁻¹ MS). As cinco leguminosas apresentaram boa fermentabilidade *in vitro*, com baixo tempo de colonização (~ 4 h) e T ½ (tempo gasto para atingir metade do valor da Produção Potencial de Gases) inferior a 25 h. A técnica *in vitro* de incorporação de radiofósforo mostrou efeito significativo da adição de polietileno glicol (PEG) na avaliação da síntese microbiana, demonstrando o efeito dos taninos presentes

nas leguminosas estudadas sobre a síntese de proteína no rúmen. O segundo trabalho (Capítulo 4) refere-se à caracterização e avaliação nutricional *in vitro* de *Medicago sativa* (Alfafa), *Cajanus cajan* (Feijão guandu), *Mucuna aterrina* (Mucuna preta) e *Mucuna pluriens* (Mucuna cinza). A composição química, a quantificação de taninos e a cinética de fermentação destas leguminosas e dietas experimentais constituídas de feno de Tifton-85 (*Cynodon sp*), milho triturado, sal mineralizado na proporção de 30:18:2 com a adição (50%) de cada uma das leguminosas foram estudadas (tratamento ALF, GND, MCZ, MPT respectivamente para Alfafa, Feijão guandu, Mucuna cinza e Mucuna preta). Alfafa apresentou o maior conteúdo de proteína bruta (185 g kg⁻¹ MS) e os teores de taninos variaram significativamente entre as plantas estudadas. Mucuna cinza apresentou maior e Alfafa menor valores de tanino condensado (50 e 0,2 eg. G leucocianidina kg⁻¹ MS respectivamente). Com exceção da Alfafa, todas as outras leguminosas apresentaram incremento de gases quando incubadas *in vitro* na presença de PEG; o que reflete a atividade biológica dos taninos presente nestas plantas. Em relação às dietas experimentais, apenas as dietas GND e MCZ apresentaram incrementos de gases na presença de PEG. O terceiro trabalho (Capítulo 5) descreve a avaliação nutricional *in vivo* das dietas experimentais utilizadas no Capítulo 4 (ALF, GND, MCZ, e MPT). Foram utilizados ovinos da raça Santa Inês, machos, castrados com peso vivo médio de 53 ± 5,1 kg. As dietas foram oferecidas de acordo com o peso vivo de cada animal (3%) durante o ensaio de consumo voluntário, enquanto que durante o ensaio de digestibilidade, foi oferecida em cerca de 90% do consumo voluntário determinado anteriormente. Nenhuma dieta apresentou quantidade de taninos condensados considerado prejudicial aos animais. Todas as dietas estudadas apresentaram consumo voluntário e consumo de nutrientes semelhantes. Apenas ALF apresentou maior digestibilidade de PB, enquanto que a MCZ apresentou menor digestibilidade da mesma fração. É concluído com esses trabalhos que as leguminosas estudadas constituem uma importante fonte de nutrientes para os ruminantes, contudo, os teores de taninos condensados devem ser monitorados a fim de que sejam preparadas dietas que não alterem o consumo voluntário nem a fermentação ruminal, e conseqüentemente disponibilização dos nutrientes aos animais.

Palavras-chave: análise de taninos, produção de gases, efeitos anti-nutricionais, composição nutricional

ABSTRACT

GODOY, P.B. **Nutritional aspects of phenolic compounds in sheep fed with leguminous forage** 2007. 94 f Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

Leguminous plants constitute an important source of food for the ruminants and they can be explored as direct grazing or, if conserved, for supply in the form of hay or silage. Some of those plants possess phenolic compounds in its composition. The chemical characterization of such plants make possible better use of them in the animal feeding as well as a better understanding of the positive and negative effects of the phenolic compounds in the nutrition of the animals. It was aimed with the present study: (i) to evaluate the chemical composition of five leguminous plants of interest for the feeding of ruminant; (ii) to study the effects of the tannins of different leguminous plants in the *in vitro* gas production assay; and (iii) to study the effects of diets constituted with these leguminous plants in the voluntary intake and apparent digestibility of the nutrients in sheep. The first work (Chapter 3) refers to the characterization *in vitro* of the leguminous foragers (*Leucaena leucocephala* (Leucena), *Arachis pintoii* (Amendoim forrageiro), *Stylosanthes guianenses* cv mineirão (Estilosantes mineirão), *Stylosanthes guianenses* cv Campo Grande (Estilosantes Campo Grande) and *Calopogonio sp.* (Calopogônio). They were appraised for the chemical composition, the quantification of tannins, the ruminal fermentability and the microbial synthesis. The obtained results demonstrated compatible values for crude protein content, except for Calopogônio and Estilosantes Campo Grande (< 60 g kg⁻¹ DM). The tannin content varied significantly among the studied plants, however the condensed tannin content can be considered safe for the animals (between 30 to 40 eq-g leucocianidin kg⁻¹ DM). The five leguminous plants presented good *in vitro* fermentability, with low time of colonization (~ 4 h) and T ½ (time spent to reach half of the value of the potential gas production) less than 25 h. The *in vitro* technique of radio labeled phosphorus incorporation showed significant effect of the addition of polyethylene glycol (PEG) in the evaluation of the microbial

synthesis, demonstrating the effect of the presence of tannins in the studied leguminous plants. The second work (Chapter 4) refers to the characterization and *in vitro* nutritional evaluation of *Medicago sativa* (Alfalfa), *Cajanus cajan* (Feijão guandu), *Mucuna aterrina* (Mucuna preta) and *Mucuna pluriens* (Mucuna cinza). The chemical composition, the quantification of tannins and the kinetics of fermentation of these leguminous plants and four constituted experimental diets with Tifton-85 hay (*Cynodon sp*), corn grain, mineralized salt (30:18:2) with the addition (50%) of each one of the leguminous plants were studied (treatment ALF, GND, MCZ, MPT respectively for Alfalfa, Feijão guandu, Mucuna cinza and Mucuna preta). Alfalfa presented the highest content of crude protein (185 g kg⁻¹ DM) and the tannin content varied significantly among the studied plants. Mucuna cinza presented greater and Alfalfa lower values of condensed tannin (50 and 0.2 eg g leucocianidin kg⁻¹ DM respectively). Except for the Alfalfa, all the other leguminous plants presented increment of gases when incubated *in vitro* in the presence of PEG; what reflects the biological activity of the tannins present in these plants. In relation to the experimental diets, just the diets GND and MCZ presented increments of gases in the presence of PEG. The third work (Chapter 5) describes the *in vivo* nutritional evaluation of the experimental diets used in the Chapter 4 (ALF, GND, MCZ, and MPT). Santa Inês males, castrated with live weight of 53 ± 5.1 kg sheep were used. The diets were offered in agreement with the liveweight of each animal (3%) during the voluntary intake assay, while during the digestibility trial, it was offered in about 90% of the voluntary intake determined previously. No diet presented amount of condensed tannins considered harmful to the animals. All of the studied diets presented similar voluntary intake and nutrients consumption. Just ALF presented higher crude protein digestibility, while MCZ presented lower digestibility of the same fraction. It is concluded with those works that the studied leguminous plants constitutes an important source of nutrients for the ruminants, however, the condensed tannins content should be monitored so that it can prepare diets to neither alter the voluntary intake nor the ruminal fermentation, and consequently guaranteeing the supply of nutrients to the animals.

Key word-: analysis of tannins, gas production, anti-nutritional effects, nutritional composition

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Composição química das leguminosas tropicais	42
Tabela 3.2 – Parâmetros de cinética fermentativa de leguminosas na ausência e na presença de PEG e incremento de gases, em 24 h, devido a inativação dos taninos pelo PEG	45
Tabela 3.3 – Síntese de proteína microbiana (mg NM g^{-1} MS) estimada pela incorporação <i>in vitro</i> de radiofósforo na presença e na ausência de PEG, a partir de leucena, estilosantes Campo Grande e estilosantes mineirão	47
Tabela 4.1 – Composição química de feno de leguminosas	58
Tabela 4.2 – Parâmetros da cinética fermentativa de fenos de leguminosas na presença e ausência de PEG	60
Tabela 4.3 – Produção de gases das leguminosas com e sem a adição de polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação	63
Tabela 4.4 – Produção de gases das dietas experimentais com e sem a adição de polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação	65

Tabela 5.1 – Composição química dos ingredientes utilizados para constituir as dietas experimentais.....	72
Tabela 5.2 – Composição química das dietas experimentais.....	76
Tabela 5.3 – Consumo voluntário de matéria seca (CVMS) das dietas experimentais (g d^{-1} , $\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$, $\text{g kg}^{-0,75} \text{d}^{-1}$)	78
Tabela 5.4 – Consumo dos nutrientes (g d^{-1}) dos fenos de alfafa (ALF), feijão guandu (GND), mucuna cinza (MCZ) e mucuna preta (MPT) por ovinos durante ensaio de digestibilidade aparente	79
Tabela 5.5 – Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas ALF, GND, MCZ e MPT	80
Tabela 5.6 – Quantidade média de nutrientes digeridos diariamente ($\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$) por ovinos alimentados com as dietas ALF, GND, MCZ e MPT	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	<i>Características químicas dos taninos</i>	17
2.2	<i>A nutrição animal e os taninos</i>	18
2.3	<i>Quantificação dos taninos</i>	19
2.4	<i>Produção de gases in vitro</i>	20
2.5	<i>Descrição das leguminosas utilizadas nos experimentos</i>	21
2.5.1	<i>Leucaena leucocephala</i> (Leucena).....	21
2.5.2	<i>Arachis pintoi</i> (Amendoim forrageiro).....	22
2.5.3	<i>Stylosanthes guianenses</i> (Estilosantes) cv mineirão e cv Campo Grande	23
2.5.4	<i>Calopogonio sp</i> (Capologônio).....	24
2.5.5	<i>Medicago sativa</i> (Alfafa)	25
2.5.6	<i>Cajanus cajan</i> (Feijão guandu)	26
2.5.7	<i>Mucuna pruriens</i> (Mucuna cinza).....	27
2.5.8	<i>Mucuna aterrima</i> (Mucuna preta)	28
3	VALORES NUTRICIONAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS EM LEGUMINOSAS TROPICAIS	30
	Resumo	30
	Abstract	31
3	INTRODUÇÃO	32
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.2.1	<i>As plantas</i>	34
3.2.2	<i>Análises químicas</i>	35

3.2.2.1	<i>Determinação de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados</i>	35
3.2.3	<i>Produção de gases e bioensaio</i>	38
3.2.4	<i>Síntese microbiana</i>	39
3.2.5	<i>Análise estatística</i>	40
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.3.1	<i>Análises químicas</i>	41
3.3.2	<i>Produção de gases e bioensaio</i>	43
3.3.3	<i>Síntese microbiana</i>	47
3.4	CONCLUSÕES	48
4	EFEITOS DOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE OS PARÂMETROS NUTRICIONAIS <i>IN VITRO</i>	50
	Resumo	50
	Abstract	51
4.1	INTRODUÇÃO	52
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.2.1	<i>As plantas</i>	54
4.2.2	<i>Análises químicas</i>	56
4.2.3	<i>Produção de gases e bioensaio</i>	56
4.2.4	<i>Análises estatística</i>	57
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.3.1	<i>Análises químicas</i>	57
4.3.2	<i>Produção de gases</i>	59
4.4	CONCLUSÕES	65

5	EFEITO DOS TANINOS NO CONSUMO VOLUNTÁRIO E DIGESTIBILIDADE EM OVINOS ALIMENTADOS COM LEGUMINOSAS TROPICAIS.....	67
	Resumo	67
	Abstract.....	68
5.1	INTRODUÇÃO.....	69
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	69
5.2.1	<i>Local e animais</i>	<i>69</i>
5.2.2	<i>Período experimental</i>	<i>70</i>
5.2.3	<i>Dietas</i>	<i>70</i>
5.2.4	<i>Análises químicas</i>	<i>72</i>
5.2.5	<i>Ensaio de consumo voluntário.....</i>	<i>72</i>
5.2.6	<i>Ensaio de digestibilidade aparente.....</i>	<i>74</i>
5.2.7	<i>Análise estatística.....</i>	<i>75</i>
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
5.3.1	<i>Análises químicas.....</i>	<i>75</i>
5.3.2	<i>Consumo voluntário de matéria seca</i>	<i>77</i>
5.3.3	<i>Digestibilidade aparente.....</i>	<i>79</i>
5.4	CONCLUSÃO.....	81
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO GERAL

As leguminosas têm potencial para serem empregadas na alimentação animal, podendo ser exploradas para pastejo direto ou, se conservadas, para fornecimento na forma de feno ou silagem. Algumas leguminosas possuem compostos fenólicos, como por exemplo, taninos condensados, taninos totais e fenóis totais em sua composição, sendo estes de bastante interesse, devido a sua capacidade de complexar proteínas, vitaminas, íons metálicos e minerais.

A caracterização química das plantas pode auxiliar na escolha do melhor uso das mesmas na alimentação animal assim como um melhor entendimento dos efeitos positivos e/ou negativos dos compostos fenólicos na nutrição dos animais.

O conteúdo de taninos nas plantas pode variar de acordo com as condições do solo, local, clima, espécie, idade da planta e apresenta uma composição química variada sendo esta, muitas vezes, pouco conhecida. Esses compostos, quando em alta concentração, podem afetar o aproveitamento dos nutrientes pelos animais. O efeito direto destes compostos pode interferir no consumo voluntário dos animais, na inibição da fermentação no rúmen pela formação de complexos com as proteínas e fibras, tornando-as resistentes à digestão, ou indiretamente, pela ligação com enzimas digestivas, inibindo sua ação catalítica.

Os ovinos têm grande potencial de produção no Brasil e as leguminosas são alimentos de representativo potencial forrageiro. O estudo das

características digestivas das mesmas poderá trazer benefícios para a produção destes animais e contribuir para a viabilização econômica desta exploração agropecuária.

Objetivou-se com o presente estudo: (i) avaliar a composição química de cinco leguminosas de interesse para a alimentação de ruminantes; (ii) estudar os efeitos dos taninos de diferentes leguminosas na produção de gases *in vitro*; e (iii) estudar os efeitos de dietas constituídas com estas leguminosas no consumo voluntário e digestibilidade aparente dos nutrientes em ovinos.

Os resultados são apresentados na forma de capítulos. O terceiro capítulo refere-se à caracterização *in vitro* das leguminosas forrageiras *Leucaena leucocephala* (leucena), *Arachis pintoii* (amendoim forrageiro), *Stylosanthes guianenses* cv mineirão (estilosantes mineirão), *S. guianenses* cv Campo Grande (estilosantes Campo Grande) e *Calopogonio* sp. (calopogônio). O quarto capítulo refere-se à caracterização e avaliação nutricional *in vitro* de *Medicago sativa* (alfafa), *Cajanus cajan* (feijão guandu), *Mucuna pruriens* (mucuna cinza) e *Mucuna aterrima* (mucuna preta), e o quinto capítulo refere-se ao estudo dos efeitos de dietas constituídas com estas leguminosas no consumo voluntário e digestibilidade aparente dos nutrientes em ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Características químicas dos taninos*

Os taninos podem ser classificados em dois grupos: 1) taninos hidrolisáveis (TH), que, após hidrólise, produzem carboidratos e ácidos fenólicos; e 2) taninos condensados (TC), que são resistentes à hidrólise e são oligômeros dos grupos flavan-3-ols ou flavan 3,4-diols (SALUNKHE; CHAVAN; KADAN, 1990). Os taninos hidrolisáveis são unidos por ligações éster-carboxila, sendo prontamente hidrolisáveis em condições ácidas ou básicas (HAGERMAN; BUTLER, 1981). A unidade básica estrutural desse tipo de tanino é usualmente formada por uma D-glucose com seus grupos hidroxilas esterificados pelo ácido gálico (galotaninos) ou pelo ácido hexadihidroxifênico (elagitaninos).

Os taninos condensados (TC), ou proantocianidinas, são constituídos por unidades de flavanol: flavan 3,4-diols (leucoantocianidina) ou flavan-3-ols (catequina). Eles estão presentes em maior quantidade nos alimentos normalmente consumidos (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1986; SALUNKHE; CHAVAN; KADAN, 1990). Os TC podem conter de duas a cinquenta unidades de flavanóides, possuem estruturas complexas, são resistentes à hidrólise, mas podem ser solúveis em solventes orgânicos aquosos, dependendo de sua estrutura.

Os taninos também são caracterizados pela sua capacidade de se combinarem com proteínas da pele animal inibindo a putrefação, processo este conhecido como curtimento do couro (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE,

1986). Esses compostos são considerados potentes inibidores de enzimas devido à complexação com proteínas enzimáticas (NACZK et al., 1994). Além dessa capacidade dos taninos em precipitar proteína, eles também são capazes de interagir com outras macromoléculas, como carboidratos, membrana celular das bactérias e íons metálicos (LEINMÜLLER; KARL-HEINZ, 1991).

2.2 A nutrição animal e os taninos

Os taninos podem afetar negativamente a ingestão de alimentos pelo animal, a digestibilidade deste alimento e a eficiência da produção. Estes efeitos dependem muito da quantidade, do tipo de tanino ingerido e da tolerância do animal. Sua ação começa na cavidade oral, e depois continua no rúmen e trato gastro intestinal, onde são liberados e podem complexar com proteínas da dieta e do metabolismo (bactérias, enzimas e células epiteliais) (CANNAS, 1999).

O consumo do animal é diretamente reduzido por causa do gosto adstringente do tanino. Essa adstringência é causada quando ocorre a formação dos complexos entre os taninos e as glicoproteínas salivares (CANNAS, 1999).

Os efeitos dos taninos são mais proeminentes nos animais monogástricos e os teores acima de 1% de taninos condensados na dieta destes animais podem trazer prejuízos para produção, afetando principalmente o consumo e a digestibilidade da proteína e dos aminoácidos essenciais (McDONALD et al., 1995). Os ruminantes são mais tolerantes aos taninos devido à ação dos microrganismos do rúmen que diminuem os efeitos negativos destes

compostos, pois são capazes de degradar diversos fatores antinutricionais em compostos mais simples e não tóxicos (SELINGER; FOSBERG; CHENG, 1996).

Os efeitos adversos dos taninos incluem: redução no consumo e na digestibilidade; inibição de enzimas digestivas; perda de proteínas endógenas, e efeitos sistêmicos como resultados de produtos degradados de taninos hidrolisáveis no trato gastrointestinal (GETACHEW; MAKKAR; BECKER, 2000a). Podem reduzir a ingestão por diminuição da aceitabilidade e por afetar negativamente a digestão. A aceitabilidade é reduzida por causa dos taninos serem adstringentes. Adstringência é a sensação causada pela formação de complexos entre os taninos e a glicoproteína salivar, e pode aumentar a salivação e diminuir a aceitabilidade (REED, 1995). Quanto menor a aceitabilidade, menor a ingestão de alimento e, assim, a produtividade animal.

2.3 *Quantificação de taninos*

Devido à complexidade dos taninos, vários métodos têm sido desenvolvidos para a sua quantificação. Nenhum deles, porém, é completamente satisfatório. Os métodos mais citados na literatura para a determinação de taninos em forragens são os métodos colorimétricos.

A preparação das amostras tem grande influência na determinação de taninos e na relação com os polifenóis das plantas (REED, 1995). Os métodos gravimétricos foram desenvolvidos para tentar resolver o problema do uso de padrões (MAKKAR et al., 1993), mas também dependem da eficiência da extração. Há atualmente uma grande tendência no uso de técnicas *in vitro*, como

a produção de gases, para avaliar forragens e os efeitos dos taninos na fermentação no rúmen (GETACHEW, 1999).

2.4 *Produção de gases in vitro*

A técnica *in vitro* de produção de gases é metodologia reconhecida para descrição da cinética fermentativa dos alimentos. A produção de gases é diretamente proporcional à fermentação microbiana do alimento e como pode ser medida a intervalos freqüentes, permite uma descrição bastante importante da cinética fermentativa de diferentes alimentos (BUENO et al., 2005).

Estudos recentes têm demonstrado que a produção de gases possui alta correlação com a digestibilidade e com a degradabilidade do alimento. A grande vantagem desta metodologia é a praticidade de se medir a produção de gases com o uso de um transdutor, possibilitando a avaliação de um grande número de amostras ao mesmo tempo. Através dos valores de pressão obtidos, pode-se calcular o volume dos gases produzidos e estimar a quantidade de substrato que foi digerida (THEODOROU et al., 1994; PEREZ, 1997; MAURICIO et al., 1998, BUENO et al., 2005). Os dados de pressão, após serem convertidos em volume podem ser ajustados através do modelo matemático de France et al. (1993).

Na avaliação de fatores anti-nutricionais através da produção de gases, nota-se que os efeitos destes fatores na fermentação do rúmen são refletidos pela queda da produção de gases (GETACHEW et al., 1998; SINGH;

BHAT; SHARMA, 2001), podendo também interferir na determinação da digestibilidade *in vitro* (KHAZAAL et al., 1993; CABRAL FILHO et al., 2005).

Segundo Makkar et al. (1993), a associação de diferentes métodos de avaliação de alimentos pode ser mais útil na determinação dos efeitos negativos dos taninos, pois promove um maior entendimento destes efeitos nos sistemas biológicos e podem facilitar a interpretação da digestibilidade da matéria seca de forrageiras ricas em taninos, obtidas pelos métodos *in sacco* e *in vitro*.

Khazaal e Ørskov (1994) e Getachew et al. (1998) notaram maior produção de gases e maior atividade biológica dos microrganismos do rúmen na presença do PEG. Também Getachew, Makkar e Becker. (2000b; 2000c e 2001) adicionaram o PEG na incubação, o que resultou numa maior produção de gases, maior concentração de nitrogênio amoniacal e maior produção de ácidos graxos de cadeia curta. Com isso, houve uma melhor fermentação ruminal resultando numa melhor sincronização da energia disponível e degradabilidade do nitrogênio, o que aumenta conseqüentemente o desempenho do animal.

2.5 Descrição das leguminosas utilizadas nos experimentos

2.5.1 *Leucaena leucocephala* (leucena)

A *Leucaena leucocephala* é originária do continente americano, ocorrendo em toda América Central e parte da América do Sul (HUGHES, 1998). É a espécie mais utilizada em sistemas agrícolas, como adubação verde, na alimentação animal e como fonte de madeira para confecção de lenha. Apresenta

porte arbóreo, com altura variando de 3 a 20 metros, e grandes produções de madeira, sementes e forragens. Os teores de proteína bruta nas folhas estão ao redor de 24%.

Apresenta algumas limitações, como por exemplo, baixa tolerância à geadas e à seca, baixo crescimento em solos ácidos, madeira pouco durável, presença de fatores antinutricionais (mimosina (HUGHES, 1998), taninos e fenóis (VITTI et al., 2005; LONGO, 2002)) e em solos de alta fertilidade ela pode se tornar uma praga, pois possui alta capacidade de produção de sementes (HUGHES, 1998).

No Brasil o genótipo mais plantado é o cultivar australiano Cunningham (LOCH; FERGUSON, 1999), proveniente do cruzamento entre os tipos “Salvadorenho e Peru”, este cultivar é altamente produtivo em solos de boa fertilidade, tem baixo porte e alta capacidade de ramificar-se.

2.5.2 *Arachis pinto* (amendoim forrageiro)

O *Arachis pinto* é uma espécie nativa dos cerrados do Brasil, adaptada aos solos ácidos e de baixa fertilidade, possui características como alta produção de forragem de boa qualidade, alta capacidade de fixar nitrogênio e boa tolerância ao sombreamento. Coletado pela primeira vez em 1954 e lançado pela Austrália como cultivar Amarillo, em 1987. No Brasil, os cultivares mais comercializados são o cv. MG 100 (Matsuda Genética 100), o cv. Alqueire-1 e o cv. Belmonte (BRA 0311828) (SILVA, 2004a).

De hábito estolonífero é uma leguminosa perene com excelente potencial para uso como cobertura verde. Pode se propagar através de semente, estolão ou coroa com parte da raiz. Tem se adaptado bem em várias partes da América Tropical e do Brasil, com o mérito de associar qualidade nutricional e persistência, características raramente encontradas juntas em leguminosas tropicais.

Seu uso na agropecuária é como forrageira em consorciação com as principais gramíneas tropicais e como cobertura verde em culturas perenes. Caracteriza-se por uma alta produção de matéria seca (5 a 13 t/ha/ano) e os teores de proteína estão entre 13 a 25 %. A aceitabilidade é alta e os animais em pastejo selecionam o *A. pintoi* durante todo o ano, promovendo ganhos de peso na ordem de 440 g/dia (ARGEL; VILLARREAL, 1998).

2.5.3 *Stylosanthes guianenses* (estilosantes) cv mineirão e cv Campo Grande

O gênero *Stylosanthes* tem seu centro de origem nos trópicos. Apresenta o maior número de cultivares, dentre as leguminosas tropicais, possui 44 espécies, sendo que 25 ocorrem no Brasil, principalmente na região do Cerrado (FERREIRA; COSTA, 1979). No Brasil, oito cultivares foram liberados comercialmente no mercado. As espécies *S. guianensis*, *S. capitata* e *S. macrocephala* são as principais espécies com potencial de uso no Brasil. Atualmente encontram-se no mercado dois cultivares deste gênero, o estilosantes Mineirão e o Campo Grande.

São bastante tolerantes a solos arenosos, muito resistentes à seca, por isso são muito usados para recuperar áreas degradadas. O estiloso Mineirão é perene, semi-ereto, podendo atingir 2,5 m de altura. É muito tolerante à antracnose e permanece verde durante o período seco. Os teores de proteína bruta na parte aérea variam de 12 a 18%. Possui boa adaptação e desempenho desde Roraima até São Paulo e Mato Grosso do Sul. É recomendado para ser utilizado em pastagens consorciadas, banco de proteína, recuperação de pastagens ou em associação com culturas anuais como adubo verde (SILVA; ZIMMER, 2005).

Outro cultivar encontrado no mercado é o multilinha Campo Grande. Esse cultivar foi desenvolvido pela Embrapa Gado de Corte. É uma mistura física de sementes com 80% (em peso) de linhagens de *S. capitata* tolerantes à antracnose e 20% de linhagens de *S. macrocephala*. Este cultivar tem apresentado bom desempenho em solos com textura arenosa e média, como os Latossolos textura média e Areias Quartzosas. A principal forma de utilização é em consorciação com *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha* e *Andropogon gayanus*. Existe um grande potencial na utilização deste cultivar em recuperação de pastagens e de áreas degradadas (SILVA, 2004b).

2.5.4 *Calopogonio* sp. (calopogônio)

O *Calopogonio* sp. é originário da América do Sul, América Central e Índia Ocidental. São herbáceas perenes, com hábito de crescimento rasteiro e trepador, densamente cobertas com pêlos de coloração ferruginosa (ANDRADE;

SOUZA; VILLAÇA, 1970).

Adapta-se facilmente a solos em condições ácidas e de baixa fertilidade, mas é pouco tolerante a períodos secos prolongados.

Inicialmente essa leguminosa foi utilizada como cobertura do solo, abubo verde e mais tarde como forrageira. A parte aérea desta leguminosa apresenta boa palatabilidade para alimentação animal, podendo ser utilizada para pastejo rotativo e em consorciamento com gramíneas (ALLEN; ALLEN, 1981).

O consumo da forrageira é baixo quando as plantas estão verdes, geralmente atribuídos à presença de pêlos abundantes existentes nas folhas e talos, aumentando no período seco, quando já estão secas e a disponibilidade de matéria seca é reduzida (BOGDAN, 1977). Segundo Andrade, Souza e Villaça (1970) essa leguminosa apresentou 15,9% de proteína bruta.

2.5.5 *Medicago sativa* (alfafa)

A *Medicago sativa* (alfafa) é uma das mais importantes forrageiras cultivadas em termos mundiais. Possui inúmeras características relevantes, como grande adaptação agrônômica, efetividade na fixação do nitrogênio e eficiência energética de crescimento, além disso, ela é uma espécie versátil quanto a sua utilização, ou seja, podendo ser fenada, ensilada e pastejada (BARNES; SHEAFFER, 1995).

Por ser originária de regiões próximas ao Irã, com invernos frios e verões secos e quentes, são resistentes à seca. A área cultivada no mundo é cerca de 70% somente nos Estados Unidos, antiga União Soviética e Argentina.

O restante inclui Canadá, Itália e China. No Brasil, os principais estados produtores são Rio Grande do Sul e São Paulo (SAIBRO, 1985).

É uma planta perene, de hábito tipicamente ereto, e com alta produção de forragem. Prefere solos profundos, permeáveis, bem drenados, férteis e com pH entre 6 e 7 (MICHAUD; LEHMAN; RUMBAUGH, 1988). No Brasil, a principal forma de utilização é a fenação, processo que requer cuidados especiais desde a implantação até o término do feno (MARTIN, 1994). Segundo Bueno (2002), esta leguminosa apresentou teor de 19,08% de proteína bruta.

2.5.6 *Cajanus cajan* (feijão guandu)

O *Cajanus cajan* (feijão guandu) é uma planta encontrada com frequência em todo o Brasil Central, podendo ser observado nos quintais domésticos dos bairros da maioria das cidades desta região. Esta popularidade deriva do fato de seus grãos verdes serem muito palatáveis, podendo substituir ervilhas, e seus grãos secos poderem ser empregados da mesma forma que o feijão para consumo humano, além de serem avidamente consumidos por aves domésticas.

Esta leguminosa foi introduzida no Brasil e Guianas pela rota dos escravos procedentes da África, tornando-se largamente distribuída e semi-naturalizada na região tropical, onde assumiu importância como fonte de alimento humano, forragem e também como cultura para adubação verde (OTERO, 1952; DÖBEREINER; CAMPELO, 1977; MORTON et al., 1982).

O feijão guandu situa-se entre as mais importantes culturas de leguminosas, porque é capaz de produzir colheitas elevadas de sementes ricas em proteína, mesmo em solos de baixa fertilidade estando adaptada a altas temperaturas e a condições de seca (SKERMAN, 1977; MORTON et al., 1982).

O feijão guandu apresenta 14 a 22% de PB, dependendo da quantidade de folhas, vagens e hastes existentes no momento da colheita.

A planta prefere solos bem drenados e profundos, mas pode vegetar em solos argilosos pesados. É nos solos vermelhos (bem drenados), no entanto, que forma o maior número de nódulos, nos quais o *Rhizobium* se mantém ativo na fixação de N por mais tempo.

Um trabalho realizado por Cunha, Silva e Mattos (1976) vem ressaltar este ponto, quando o feno de guandu utilizado como único componente volumoso de uma ração para a engorda de novilhos (40% volumoso e 60% concentrado) permitiu ganhos de peso diários de 1,764 kg/cab. Estes ganhos de peso foram, estatisticamente, superiores aos obtidos com outro lote de animais em que o feno de guandu foi substituído pelo feno de coloniã. Este último lote apresentou uma média de ganho de peso de 1,555 kg/cab.dia.

2.5.7 *Mucuna pruriens* (mucuna cinza)

A *Mucuna pruriens* (mucuna cinza) é planta de grande resistência, anual, trepadora, de crescimento rápido e vigoroso, boa cobertura de solo, compete com as invasoras, e bom aporte de nitrogênio. Adaptada aos solos ácidos, é bastante resistente à seca.

Devido ao efeito alelopático ela é considerada má hospedeira dos nematóides por isso é muito usada no controle dos mesmos e de plantas invasoras. Também pode ser usada para ser consorciada com o milho, sorgo, milho e abubação verde por ser grande fixadora de nitrogênio e muito rica em nutrientes.

Adjorlolo, Amaning-Kwarteng e Fianu (2001) encontraram valores de 17-21% de proteína bruta.

2.5.8 *Mucuna aterrima* (mucuna preta)

A *Mucuna aterrima* (mucuna preta), originária da África é uma leguminosa anual que possui alta rusticidade, não é tão exigente quanto à fertilidade do solo, sendo que pode ser indicada para solos arenosos e argilosos de baixa e média fertilidade, porém não tolera solos de baixa drenagem.

É uma trepadeira muito utilizada no controle de nematóides e invasoras, pode ser usada para ser consorciada com o milho, sorgo, milho e abubação verde por ser grande fixadora de nitrogênio e muito rica em nutrientes.

A prática de adubação verde consiste em utilizar plantas em rotação, sucessão ou consorciação com as culturas principais ou comerciais, incorporando-as levemente ao solo ou deixando-as na superfície, visando à proteção superficial, bem como à manutenção e à melhoria das características físicas, químicas e biológicas do solo. Eventualmente, partes das plantas usadas como adubos verdes podem ser utilizadas para produção de sementes, fibras, alimentação animal, etc.

Iyayi, Kluth, Rodehutsord (2006) encontraram valor de 18-20% de proteína bruta.

3 VALORES NUTRICIONAIS E COMPOSTOS FENÓLICOS EM LEGUMINOSAS TROPICAIS

Resumo

No presente trabalho, objetivou-se caracterizar as leguminosas *Leucaena leucocephala* (leucena), *Arachis pintoii* (amendoim forrageiro), *Stylosanthes guianenses* (estilosantes) cv mineirão, *S. guianenses* (estilosantes) cv Campo grande e *Calopogonio* sp. (calopogônio) quanto à composição química, quantificação de taninos, fermentabilidade ruminal e síntese microbiana. Foram colhidas três amostras de cada planta (pontos diferentes) simulando o pastejo dos animais. As amostras foram secas a 40°C e as determinações seguiram a literatura. A análise química indicou que o calopogônio e o estilosantes cv Campo Grande apresentaram os menores teores de proteína bruta (PB), 60 e 56 g kg⁻¹ MS de PB, respectivamente. O estilosantes cv Campo Grande apresentou maiores teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), 561 e 393 g kg⁻¹ MS, respectivamente, enquanto que a leucena apresentou neste trabalho menores teores dos mesmos componentes, 295 e 178 g kg⁻¹ MS, respectivamente. Os resultados mostraram que a concentração de fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e taninos condensados (TC) variaram significativamente entre as espécies estudadas. Os valores de FT, TT e TC foram significativamente (P<0,05) maiores para leucena. Estilosantes cv mineirão e leucena apresentaram os valores mais altos de TC, o inverso ocorreu com o calopogônio. Embora todas as leguminosas tenham apresentado teores de TC em sua composição química, todas estão dentro da faixa considerada segura para os ruminantes (30 a 40 eq-g leucocianidina kg⁻¹MS). Todas as leguminosas estudadas apresentaram boa fermentabilidade ruminal *in vitro*, com um tempo de colonização inferior a 4 h e tempo gasto para atingir metade do valor da Produção Potencial de Gases inferior a 25 h. A técnica *in vitro* de incorporação de radiofósforo mostrou efeito significativo da adição de polietileno glicol (PEG) na avaliação da síntese microbiana, demonstrando o efeito dos taninos presentes nas leguminosas estudadas sobre a síntese de proteína no rumem. Pode-se

concluir que as leguminosas estudadas apresentaram teores na composição química compatíveis com um bom potencial de utilização na alimentação de ruminantes e nenhuma delas apresentou quantidades de compostos fenólicos considerados prejudiciais aos animais, com boa qualidade de fermentabilidade ruminal, e a técnica *in vitro* de incorporação de radiofósforo conseguiu demonstrar efeitos dos taninos na síntese de proteína microbiana.

Palavras-chave: taninos, fermentabilidade ruminal, antinutricional, produção de gases, polietileno glicol

NUTRITIONAL VALUES AND PHENOLICS COMPOUNDS IN TROPICAL LEGUMES

Abstract

In the present work, it was aimed to characterize the leguminous plants *Leucaena leucocephala* (leucena), *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro), *Stylosanthes guianenses* cv mineirão (Estilosantes mineirão), *S. guianenses* cv campo grande (Estilosantes campo grande) and *Calopogonio sp.* (Calopogônio) as for the chemical composition, quantification of tannins, ruminal fermentability and microbial synthesis. They were picked three samples of each plant (different points) simulating the animals grazing. The samples were dry to 40°C and the determinations followed the literature. The chemical analysis indicated that the Calopogônio and the Estilosantes campo grande presented the lower value of crude protein (CP), 60 and 56 g kg⁻¹DM, respectively. The Estilosantes campo grande presented higher neutral detergent fibre content (NDF) and acid detergent fiber (ADF), 561 and 393 g kg⁻¹ DM, respectively, while the leucena presented in this work lower content of the same components, 295 and 178 g kg⁻¹ DM, respectively. The results showed that the concentration of total phenols (TF), total tannins (TT) and condensed tannins (CT) varied significantly among the studied species. The values of TF, TT and CT were significantly ($P < 0.05$) higher for Leucena. Estilosantes mineirão and Leucena presented the highest values of CT,

the inverse happened with the Calopogônio. Although all of the leguminous plants have presented CT content in its chemical composition, all are inside of the considered strip holds for the ruminants (30 to 40 eq g leucocianidin kg⁻¹ DM). All of the studied leguminous plants presented good ruminal fermentability *in vitro*, with a time for colonization less than 4 h and time to reach half of the value of the Potential Gas Production less than 25 h. The *in vitro* technique of radio labeled phosphorus incorporation showed significant effect of the addition of polyethylene glycol (PEG) in the evaluation of the microbial synthesis, demonstrating the effect of the presence tannins in the studied plants on the rumen protein synthesis. It can be concluded that the studied leguminous plants presented compatible chemical composition content with a good use potential in the feeding of ruminant and none of them presented amounts of phenolic compounds considered harmful to the animals, with good quality of ruminal fermentability, and the technique *in vitro* of radiofósforo incorporation got to demonstrate effects of the tannins in the synthesis of microbial protein.

Key words: tannins, ruminal fermentability, anti-nutritional factors, *in vitro* gas production.

3.1 INTRODUÇÃO

A avaliação nutricional de alimentos para ruminantes tem sido de grande importância para adequar a formulação de dietas. Muitas leguminosas tropicais possuem potencial para a alimentação e podem ser importantes fontes de forrageiras para ruminantes, mas podem possuir compostos fenólicos em sua composição, sendo os taninos bastante estudados, devido a sua capacidade de complexar proteínas, vitaminas, íons metálicos e minerais.

A caracterização química das plantas possibilita melhorar o uso das mesmas na alimentação animal assim como um melhor entendimento dos efeitos positivos e negativos dos compostos fenólicos na nutrição dos animais. O conteúdo de taninos nas plantas pode variar de acordo com as condições climáticas, espécie e idade da planta, e apresenta uma composição química variada sendo, muitas vezes, pouco conhecida. Esses compostos, quando em alta concentração, podem afetar o consumo voluntário, inibir a fermentação no rúmen pela formação de complexos com as proteínas e fibras, tornando-as resistentes à digestão, ou pela ligação com enzimas digestivas, inibindo sua ação catalítica.

Técnicas *in vitro* são menos onerosas e facilitam o controle das condições experimentais. Essas técnicas podem ser eficientes desde que sejam facilmente reproduzíveis e altamente correlacionadas com os resultados obtidos *in vivo* (GETACHEW et al., 1998). A técnica *in vitro* de produção de gases tem sido utilizada com a finalidade de estudar o efeito dos fatores antinutricionais presentes em algumas leguminosas na fermentação ruminal e digestibilidade da matéria seca. Essa metodologia juntamente com a adição de agentes ligantes aos taninos, como por exemplo, o polietileno glicol, vem sendo estudada por vários pesquisadores (MAKKAR; BLUMMEL; BECKER, 1995a; GETACHEW; MAKKAR; BECKER, 2000a).

Os ruminantes necessitam de proteína para a produção e manutenção, a qual pode ser suprida pela degradação de proteína no rúmen, do nitrogênio endógeno reciclado via saliva, da proteína dietética não degradada no rúmen e da proteína animal (BOER; MURPHY; KENNELLY, 1987). Portanto é importante o conhecimento da produção do nitrogênio microbiano a partir da dieta fornecida

aos animais. Pode-se usar a técnica de radiofósforo para a determinação da síntese microbiana, onde através de uma amostra do líquido do rúmen pode-se medir a taxa de incorporação do ^{32}P *in vitro*, avaliando assim a atividade microbiana (GOBBO, 2001).

Os objetivos deste trabalho foram (i) investigar a composição química e a cinética de fermentação de algumas leguminosas; (ii) estudar o efeito dos taninos na síntese de proteína microbiana.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 *As plantas*

As coletas das leguminosas *Leucaena leucocephala* (leucena), *Arachis pintoi* (amendoim forrageiro) e *Stylosanthes guianenses* (estilosantes) cv mineirão foram realizadas na Embrapa Centro – Oeste (Brasília – DF), e das leguminosas *Stylosanthes guianenses* (estilosantes) cv Campo Grande e *Calopogonio* sp. (calopogônio), na Apta Regional Pólo Centro Sul. A coleta foi realizada do mesmo modo para as cinco leguminosas. Nas áreas de coletas foram selecionados três pontos diferentes e nesse local o material foi coletado de cinco plantas de cada espécie, num total de 2 kg de matéria verde, para cada uma. Essa amostragem foi feita simulando o pastejo dos animais.

As amostras foram secas em estufa a 40°C, com circulação forçada por 48 h no Laboratório de Nutrição Animal do CENA-USP. Depois de realizada

essa primeira etapa, as amostras foram colocadas em sacos de papel, identificadas e posteriormente realizadas as análises.

Foi feita a moagem das amostras em moinho do tipo Wiley, usando peneiras de perfuração de 1 mm para as análises químicas e para a técnica *in vitro* e de 0,25 mm para a determinação de compostos fenólicos. O material moído foi armazenado em potes plásticos e em temperatura ambiente, em local arejado e escuro, para evitar a degradação dos taninos.

3.2.2 Análises químicas

As plantas foram caracterizadas quimicamente segundo a AOAC (1995) (MS - matéria seca; MM - matéria mineral; MO – matéria orgânica; e PB – proteína bruta). Os teores em fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo Mertens (2002). Os conteúdos de fenóis totais e taninos totais foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu e taninos condensados (proantocianidinas) pelo método butanol-HCl (MAKKAR, 2000), conforme descrito a seguir.

3.2.2.1 Determinação de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados

Extração das frações solúveis

Para a extração das frações a serem analisadas, 200 mg de amostra seca e moída (0,25 mm) foram adicionados a 10 ml de solução água:acetona (30:70, v/v) e submetidos a banho ultrassônico (KERRY ULTRASONICS LIMITED

– MODELO 250), por 20 min. Os conteúdos foram centrifugados por 10 min ($3000 \times g$) a 4°C (centrífuga IEC CENTRA – 7R). O sobrenadante foi coletado e conservado em gelo.

A curva padrão para fenóis e taninos foi feita utilizando-se solução padrão de ácido tânico (Merck – $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$) e a leitura foi feita em espectrofotômetro (DU – 64 BECKMAN) em absorvância, a 725 nm.

O reagente Folin Ciocalteu (1 N) foi preparado utilizando-se o reagente comercial Folin Ciocalteu (2 N) (Merck) diluído 1:1 (v/v) com água destilada. A solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi preparada a partir de solução contendo 18,53 g de Na_2CO_3 dissolvidos em 250 ml de água destilada (solução 20 % p/v).

Determinação de fenóis totais

Para a análise de fenóis e taninos, várias diluições das amostras foram testadas previamente, dependendo da concentração presente nas amostras. A melhor diluição foi aquela, a qual os resultados ficaram na faixa mediana da curva padrão.

Em tubos de ensaio, foram adicionados: 50 μl do sobrenadante (extração descrita acima) referente a cada amostra (em duplicata), 450 μl de água destilada, 250 μl do reagente Folin Ciocalteu (1 N) e 1,25 ml de solução de carbonato de sódio a 20%. Os tubos foram agitados e, após 40 min, foi feita a leitura em espectrofotômetro (DU – 64 BECKMAN), em absorvância a 725 nm. O teor de fenóis totais (FT) foi calculado em equivalente de ácido tânico, pela curva de calibração, e expresso com base na matéria seca.

Determinação de taninos totais

Foram pesados 100 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (SIGMA P-6755) em tubos de ensaio e, nestes tubos, adicionados 1 ml de água destilada e 1 ml do sobrenadante resultante da extração descrita anteriormente. Após agitação, os tubos foram colocados em geladeira por 15 min e em seguida, agitados novamente. Os tubos foram centrifugados a 3000 $\times g$ por 10 min a 4°C (centrífuga IEC CENTRA – 7R) e o sobrenadante foi coletado. Do sobrenadante, 100 μ l foram pipetados em tubos de ensaio (em duplicata), e aos tubos foram adicionados 400 μ l de água destilada, 250 μ l do reagente Folin-Ciocalteu (1 N) e 1,25 ml de solução de carbonato de sódio a (20%). Após 40 min, foi feita a leitura em espectrofotômetro, em absorvância a 725 nm. Obteve-se assim a concentração de fenóis simples.

Para a obtenção dos taninos totais, foi feita a diferença entre o teor de fenóis totais e fenóis simples.

Determinação de taninos condensados

Os reagentes utilizados para a determinação dos taninos condensados foram butanol-HCl (95:5 v/v), preparado com 950 ml n-butanol em 50 ml HCl concentrado (37%), e reagente férrico (16,6 ml HCl 2 N e 2,0 g sulfato férrico de amônio).

Foram adicionados, em três tubos de ensaio, 0,5 ml do sobrenadante (extrato citado acima), 3 ml de reagente butanol-HCl e 0,1 ml de reagente férrico, sendo posteriormente agitados. Dois tubos foram colocados em banho-maria a

100°C, por 1 h. Um dos tubos foi mantido sem aquecimento sendo considerado branco, cujo valor foi subtraído dos tubos aquecidos.

Os tubos foram esfriados e as leituras foram feitas através de espectrofotômetro (DU – 64 BECKMAN) em absorvância a 550 nm. Os valores de taninos condensados, expressos como equivalente-grama de leucocianidina kg^{-1} MS foram calculados pela fórmula:

$$(A_{550\text{nm}} \times 78,26 \times \text{fator de diluição}^*) / (\text{g kg}^{-1} \text{ MS}) * \text{fator de diluição igual a 1.}$$

Essa fórmula assume que o coeficiente $E^{1\%, 1 \text{ cm}, 550\text{nm}}$ de leucocianidina é 460 (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1986).

3.2.3 Produção de gases e bioensaio

A técnica de produção de gases e o bioensaio foram conduzidos de acordo com Maurício et al. (1998) e Bueno et al. (2005).

O inóculo constituiu-se de material do rúmen coletado de ovinos machos adultos, castrados, da raça Santa Inês, providos de cânula permanente de rúmen e alimentados a pasto com a suplementação diária de 500 g de concentrado comercial.

Para o preparo do inóculo, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram coletadas separadamente e misturadas na proporção de 50% de material da fase sólida e 50% da fase líquida, sendo homogeneizadas em um liquidificador por 10 s. Isto foi feito para a recuperação dos microrganismos celulolíticos que se aderem fortemente à fração sólida. O material resultante foi

filtrado em três camadas de tecido de algodão (fralda). As frações filtradas foram misturadas e mantidas em banho-maria a 39°C, com dióxido de carbono insuflado sobre o inóculo continuamente.

Os seguintes horários foram usados para medida de pressão dos gases produzidos: 3, 6, 9, 12, 16, 24, 36, 48, 72 e 96 h após inoculação, que foi feita por meio de um transdutor - medidor de pressão (PDL800, LANA/CENA-USP, Piracicaba/SP) conforme proposto por (THEODOROU et al., 1994). A quantidade de gases foi estimada através da fórmula: $V=0,1171p^2+4,7659p$ (NOZELLA, 2006) onde V é o volume de gases (ml) e p é a pressão medida (psi).

De cada leitura de pressão, foi subtraído o total produzido pelas garrafas sem substrato (branco), referente a cada amostra. Os parâmetros da produção de gases foram ajustados de acordo com o modelo desenvolvido por France et al. (1993).

O bioensaio foi feito para avaliar os efeitos dos taninos nas leguminosas utilizando-se polietileno glicol (PEG). As amostras foram colocadas em garrafas de vidro de 160 ml, previamente identificadas e nestas, foi colocado cerca de 1 g de amostra sendo que em duas garrafas foi adicionado 1 g de PEG de acordo com Makkar, Blümmel e Becker (1995a). Também foram preparadas quatro garrafas sem substrato, usadas como branco (duas com PEG e duas sem PEG). A cada garrafa foram adicionados 90 ml de solução nutritiva e 10 ml de inóculo conforme Bueno et.al (2005). As garrafas foram fechadas com rolhas de borracha, homogeneizadas e em seguida levadas à incubadora a 39°C. Este foi considerado o tempo zero. O período de incubação foi de 24 h.

3.2.4 Síntese microbiana

A incorporação *in vitro* de radiofósforo foi determinada somente para estilosantes mineirao, estilosantes Campo Grande e leucena pelo método de Van Nevel e Demeyer (1977) com alterações sugeridas por Bueno (1998) e Gobbo (2001). O inóculo usado foi coletado e preparado conforme descrito acima. O inóculo (16ml) foi incubado em tubos plásticos com 1g MS (matéria seca) de amostra e 4ml de solução tampão. O radiofósforo (^{32}P) (25 μl com 3700Bq, ou seja, 0,1 μCi) foi usado como traçador isotópico de proteína microbiana. Este inóculo foi incubado na ausência e na presença de 2 g de PEG. Quatro tubos foram usados para todas as amostras, dois com e dois sem PEG.

Através da incorporação do traçador isotópico no inóculo incubado, foi possível avaliar a quantidade total de massa microbiana pelas equações 1 e 2 e a quantidade total de proteína microbiana sintetizada foi determinada pela equação 3:

$$AE = A_{32P_{\text{solúvel}}} / P_{\text{total}} \quad (\text{equação 1})$$

$$P_{\text{incorp}} = A_{32P_{\text{incorp}}} \times AE \quad (\text{equação 2})$$

$$NM = 8.37 \times P_{\text{incorp}} \quad (\text{equação 3})$$

onde AE é a atividade específica; $A_{32P_{\text{solúvel}}}$ é a atividade radioativa do ^{32}P na solução; P_{total} é a quantidade total de P na solução; P_{incorp} é a quantidade de P incorporada na massa microbiana depois da incubação; $A_{32P_{\text{incorp}}}$ é a atividade radioativa do ^{32}P incorporado; MN é a quantidade de nitrogênio microbiano produzido através da relação entre N e P na massa microbiana é 8,37.

3.2.5 Análise estatística

A análise de variância foi realizada utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000). O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5%.

As médias corrigidas foram comparadas pelas diferenças mínimas significativas obtidas utilizando o teste Duncan ao nível de probabilidade de 5%.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 *Análises químicas*

Os resultados dos constituintes químicos das leguminosas usadas no experimento estão apresentados na tabela 3.1. Os teores de PB do calopogônio e do estilosantes Campo Grande foram menores do que os valores encontrados na literatura para estas leguminosas, 60,2 e 56,4 g kg⁻¹ MS de PB, respectivamente. Andrade, Souza e Villaça (1970) e Bogdan (1977) encontraram valores por volta de 159,0 g kg⁻¹ MS de PB para o calopogônio, e Silva e Zimmer (2005) encontraram teores entre 120,0 a 180,0 g kg⁻¹ de PB para estilosantes Campo Grande. Leucena apresentou neste trabalho maior teor de PB, 192,49 g kg⁻¹ MS, e enquanto Vitti et al. (2005) encontraram teor de 153 g kg⁻¹ MS de PB.

O estilosantes Campo Grande apresentou maiores teores de FDN e FDA, 560,88 e 392,58 g kg⁻¹ MS, respectivamente, não diferindo muito dos valores encontrados na literatura (ALMEIDA et al., 2003), enquanto que a leucena

apresentou neste trabalho menores teores dos mesmos componentes, 294,51 g kg⁻¹ e 177,86 g kg⁻¹ MS, respectivamente, sendo que Vitti et al. (2005) encontraram 582 e 432 g kg⁻¹ MS, respectivamente. Este fato pode-se pensar que o calopogônio e estilosantes Campo Grande estavam em idade fenológica mais avançada do que a leucena. Tal fato ocorre devido às moléculas orgânicas participarem ativamente dos processos metabólicos, e com a deposição de moléculas orgânicas não-nitrogenadas (celulose, hemicelulose e lignina), ocorre a redução no teor de compostos nitrogenados, sendo assim com o avanço da idade há a redução na proteína.

Tabela 3.1 – Composição química das leguminosas tropicais

Composição*	Leguminosas tropicais					epm
	leucena	amendoim forrageiro	estilosantes mineirão	calopogônio	estilosantes Campo Grande	
MS	425,15 ^a	356,93 ^{ab}	389,34 ^a	270,26 ^b	366,69 ^{ab}	32,5
Cinzas	49,67 ^c	61,19 ^b	74,05 ^a	60,20 ^b	56,40 ^b	1,7
EE	62,22 ^a	26,01 ^b	75,31 ^a	70,08 ^a	30,47 ^b	4,5
FDN	294,51 ^c	426,93 ^b	445,52 ^b	485,50 ^b	560,88 ^a	21,3
FDA	177,86 ^d	239,37 ^c	291,63 ^b	351,72 ^a	392,58 ^a	14,5
LDA	78,24 ^{ab}	44,14 ^c	68,93 ^b	81,67 ^{ab}	85,30 ^a	4,4
PB	192,49 ^a	156,66 ^b	104,50 ^c	60,20 ^d	56,40 ^d	8,1
NIDA	1,64 ^a	1,74 ^a	1,07 ^a	1,91 ^a	1,25 ^a	0,3
FT	71,7 ^a	11,1 ^c	26,3 ^b	18,3 ^{bc}	15,6 ^{bc}	3,7
TT	52,5 ^a	6,5 ^b	18,8 ^b	12,2 ^b	10,9 ^b	4,3
TC	34,5 ^a	14,4 ^c	25,7 ^b	0,4 ^d	3,6 ^d	1,3

* matéria seca (MS), g/kg de matéria fresca; cinzas, extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), lignina em detergente ácido (LDA), proteína bruta (PB) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), em g/kg MS; fenóis totais (FT) e taninos totais (TT), em equivalente grama de ácido tânico; e taninos condensados; em equivalente grama de leucocianidina ;

a,b,c,d valores na mesma coluna com o mesmo sobrescrito não são significativamente (P<0,05; Duncan) diferente

Houve diferenças relativamente grandes entre as espécies quanto à concentração de compostos fenólicos. Leucena apresentou significativamente altos valores de FT, TT e TC. Calopogônio, estilosantes Campo Grande e

estilosantes mineirão apresentaram valores bastante semelhantes; enquanto que amendoim forrageiro apresentou o menor valor para estes compostos ($P < 0,05$).

Os resultados de FT, TT e TC encontrados neste trabalho para leucena são maiores do que os encontrados por Vitti et al. (2005) para a mesma leguminosa (25,7 e 21,6 eq-g ácido tânico kg^{-1} MS para FT e TT, respectivamente e 12,7 eq-g leucocianidina kg^{-1} MS para TC), este fato pode ser explicado devido ao local de coleta ter sido diferente, neste trabalho a Leucena foi coletada na Embrapa Centro – Oeste (Brasília – DF) e no trabalho mencionado acima a Leucena foi coletada em Piracicaba – SP, uma vez que estes compostos podem se alterar de acordo com a idade da planta, clima, época do ano, etc.

Diversos autores citam que, para os TC, o limite considerado seguro para os ruminantes encontra-se na faixa de 30 a 40 eq-g leucocianidina kg^{-1} MS (BARRY; MANLEY; DUNCAN, 1986). De acordo com esses autores, nessa faixa, o efeito é benéfico devido à proteção contra a degradação microbiana, podendo aumentar a quantidade de proteína não degradada que chega ao intestino.

Observando-se os valores de TC nas plantas estudadas, pode-se verificar que nenhuma das leguminosas estudadas apresentou risco para os animais, quando fornecida como uma única fonte de alimento, pois todas apresentaram valores entre 0,4 – 34,5 eq-g leucocianidina kg^{-1} MS.

3.3.2 Produção de gases e bioensaio

Na Tabela 3.2, são mostrados os principais parâmetros do modelo de France et al. (1993) e outras variáveis usadas para auxiliar na compreensão da

cinética da fermentação e dos efeitos de plantas ricas em taninos na produção de gases: produção potencial de gases (A), constantes do modelo (b e c), tempo de colonização (L), tempo gasto para atingir metade do valor de A ($T_{1/2}$), taxa de fermentação em determinados horários (μ).

A produção potencial de gases (A) não apresentou diferenças significativas ($P>0,05$) entre as plantas estudadas na presença e na ausência de PEG, que pode estar relacionado aos teores de taninos destas leguminosas, conforme mostrado na Tabela 3.1, pois estes teores estão dentro do limite considerado seguro para os ruminantes.

O tempo de colonização (L) é o parâmetro que se relaciona à facilidade com que os microorganismos iniciam a degradação dos alimentos, e este não foi significativamente diferente entre as espécies. Estes valores obtidos são considerados baixos comparados com gramíneas tropicais, de acordo com Bueno et al. (2000) (7,0 a 8,3 h).

O parâmetro $T_{1/2}$ foi introduzido para compreender e comparar os alimentos do ponto de vista fermentativo, e mostra o tempo gasto para atingir metade do valor da produção potencial de gases (A). Deste modo, presumindo uma taxa de escape (k_e) teórica de 0.0208 h^{-1} , o tempo médio de retenção ruminal seria de 48 h aproximadamente. Sendo assim, o interessante seria que a maior parte da fermentação ocorresse neste período de 48 h, e os valores de $T_{1/2}$ estivessem em torno de 25 h, para que as leguminosas fossem consideradas de boa qualidade do ponto de vista fermentativo.

Tabela 3.2 – Parâmetros de cinética fermentativa de leguminosas na ausência e na presença de PEG e incremento na produção de gases, em 24 h, devido a inativação dos taninos pelo PEG

Parâmetros*	PEG	Leguminosas tropicais					epm
		leucena	amendoim forrageiro	estilosantes mineirão	calopogônio	estilosantes Campo Grande	
A (ml/g MS)	Sem	162	223	182	138	170	4,5
	Com	167	226	187	138	171	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
b (/h)	Sem	0,0596	0,1158	0,0684	0,0603	0,0723	0,0027
	Com	0,0670	0,1193	0,0700	0,0674	0,0731	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
c (/h)	Sem	-0,2366	-0,5247	-0,2332	-0,1940	-0,2513	0,0153
	Com	-0,2574	-0,5378	-0,2321	-0,2153	-0,2518	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
L (h)	Sem	3,95	5,68	2,89	2,58	3,02	0,24
	Com	3,68	5,08	2,73	2,55	2,97	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
T $\frac{1}{2}$ (h)	Sem	29,12	22,26	23,91	25,00	23,37	0,48
	Com	26,40	21,76	23,16	23,11	23,07	
	Prob	0,0008	ns	ns	0,0124	ns	
μ_{12} (/h)	Sem	0,0255	0,0590	0,0238	0,0193	0,0258	0,0018
	Com	0,0275	0,0604	0,0234	0,0213	0,0258	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
μ_{24} (/h)	Sem	0,0181	0,0417	0,0168	0,0136	0,0182	0,0013
	Com	0,0194	0,0427	0,0166	0,0151	0,0182	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
μ_{48} (/h)	Sem	0,0128	0,0295	0,0119	0,0097	0,0129	0,0009
	Com	0,0137	0,0302	0,0117	0,0107	0,0129	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
μ_{96} (/h)	Sem	0,0091	0,0209	0,0084	0,0068	0,0091	0,0007
	Com	0,0097	0,0213	0,0083	0,0076	0,0091	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
$\mu_{T\frac{1}{2}}$ (/h)	Sem	0,0164	0,0434	0,0169	0,0134	0,0185	0,0013
	Com	0,0186	0,0449	0,0169	0,0154	0,0186	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
G24 (ml/g MS)	Sem	64,2	122,6	91,5	66,2	87,6	3,7
	Com	74,7	128,0	97,3	71,8	89,4	
	Prob	ns	ns	ns	ns	ns	
Incremento (%)	-	16,70 ^a	4,42 ^b	6,48 ^b	8,47 ^{ab}	2,07 ^b	2,63

* A: produção potencial de gases, (ml g⁻¹ MS); L: tempo de colonização (h); T $\frac{1}{2}$: tempo para atingir metade de A (h); μ_{12} , μ_{24} , μ_{48} , μ_{96} : taxa de fermentação em 12, 24, 48 e 96h; $\mu_{T\frac{1}{2}}$ taxa de fermentação em T $\frac{1}{2}$; G24 gás produzido em 24h (ml g⁻¹ MS); incremento de gás em 24h (%)

^{a, b} médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P>0,05)

epm: erro padrão das médias; ns: não significativo (P>0,05)

O T $\frac{1}{2}$ mostrou que as leguminosas tiveram fácil fermentabilidade, pois os valores foram em torno de 25 h. Somente para leucena e calopogônio houve diferença significativa (P<0,05) deste parâmetro para a presença de PEG.

Interessante notar que a leucena apresentou maiores teores de FT, TT e TC em sua composição (Tabela 3.1), enquanto que calopogônio apresentou valores destes mesmos compostos fenólicos semelhantes aos estilosantes, mas o efeito da presença do PEG foi notado somente para o calopogônio em relação aos estilosantes.

Há uma correlação entre a quantidade de PB, FDN e FDA e a produção de gases, ou seja, a quantidade de parede celular pode interferir negativamente na produção de gases, pois reduz a atividade microbiana devido ao aumento das condições adversas do meio com o progresso da incubação. Deste modo, esperava-se que os resultados encontrados, pudessem evidenciar esta correlação, ou seja, que a produção de gases da leucena fosse maior do que a do calopogônio e do estilosantes Campo Grande, por exemplo. Uma vez que a leucena apresentou maior teor de PB e menor de FDN e FDA, o inverso ocorreu para o calopogônio e para o estilosantes Campo Grande. Mas estas leguminosas não diferiram entre si ($P > 0,05$) para todos os parâmetros demonstrados acima.

Como pode ser observado na Tabela 3.2., as leguminosas com energia facilmente fermentecível possuem inicialmente maiores valores de μ e conforme o tempo transcorre estes componentes tornam-se escassos e as fontes de energia para a fermentação diminuem e a taxa de fermentação conseqüentemente diminui. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para a taxa de fermentação (μ) nos horários 12, 24, 48 e 96 h, devido à presença ou ausência de PEG.

Os resultados do bioensaio também estão demonstrados na Tabela 3.2.. A leucena apresentou o maior e o estilosantes Campo Grande o menor incremento de gás, em 24 h. Para as demais leguminosas o incremento foi

semelhante ($P < 0,05$). Este fato pode estar relacionado com os teores de FT, TT e TC destas leguminosas, uma vez que a leucena também apresentou maiores teores destes compostos em relação às outras leguminosas.

Segundo Vitti et al. (2005), algumas plantas podem apresentar respostas variadas tanto *in vitro* como *in vivo*, e isto se deve à conformação química das moléculas dos taninos, resultando em diferentes atividades biológicas.

3.3.3 Síntese microbiana

Os resultados da produção líquida de proteína microbiana após 8 h de incubação com radiofósforo são apresentados na Tabela 3.3.

Devido à insuficiência de amostras das leguminosas amendoim forrageiro e calopogônio, as mesmas não foram determinadas quanto ao valor de nitrogênio microbiano.

Tabela 3.3 – Síntese de proteína microbiana ($\text{mg NM.g}^{-1} \text{MS}$) estimada pela incorporação *in vitro* de radiofósforo na presença e na ausência de PEG, a partir de leucena, estilosantes Campo Grande e estilosantes mineirão

Plantas	Nitrogênio microbiano ($\text{mg g}^{-1} \text{MS}$)	
	sem PEG	com PEG
leucena	2.04 b	12.05 a
estilosantes Campo Grande	0.83 b	6.42 a
estilosantes mineirão	0.90 b	6.08 a
amendoim forrageiro	nd*	nd*
calopogônio	nd*	nd*
<i>Média</i>	1.26 b	8.18 a

a,b médias com diferentes letras, na mesma linha, são significativamente (test;de Duncan $P < 0.05$)

* nd: não determinado

De acordo com os resultados o efeito da presença do PEG na síntese de proteína microbiana foi observado nas três leguminosas estudadas, mas devido a leucena ter apresentado maiores teores de FT, TT e TC na sua composição química, o efeito da presença do PEG foi maior para esta leguminosa do que para as demais.

Estilosantes Campo Grande e estilosantes mineirão apresentaram valores semelhantes entre si de FT, TT e TC, entretanto o efeito do PEG na síntese de proteína microbiana foi mais evidente para o estilosantes Campo Grande do que para o mineirão. O que pode também ser explicado pelas diferentes atividades biológicas dos taninos, devido às diferentes estruturas químicas e diferentes ligações dos mesmos com o PEG. Outro fator que pode estar relacionado neste caso é o fato de além destes dois cultivares serem diferentes geneticamente, eles foram coletados em locais climáticos também diferentes.

Este fato pode estar relacionado ao fato de que o PEG é um composto que se liga fortemente aos taninos, e pode cancelar seus efeitos adversos, disponibilizando os nutrientes, como proteína, para os microorganismos (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995b; MAKKAR, 2000).

3.4 CONCLUSÕES

Pode-se concluir que as leguminosas estudadas apresentaram teores esperados na composição química, com exceção do estilosantes Campo Grande e o calopogônio que apresentaram baixos teores de PB em sua composição.

Nenhuma delas apresentou quantidades de compostos fenólicos considerados prejudiciais aos animais. Todas apresentaram boa qualidade de fermentabilidade ruminal, e a técnica *in vitro* de incorporação de radiofósforo demonstrou efeito dos taninos presentes nas leguminosas estudadas sobre a síntese de proteína do rúmen.

4 EFEITO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS SOBRE OS PARÂMETROS NUTRICIONAIS *IN VITRO*

Resumo

No presente trabalho, objetivou-se i) caracterizar as leguminosas *Medicago sativa* (alfafa), *Cajanus cajan* (feijão guandu), *Mucuna pruriens* (mucuna cinza) e *Mucuna aterrima* (mucuna preta) quanto à composição química, quantificação de taninos e a cinética de fermentação; ii) estudar o efeito dos taninos na produção de gases *in vitro* dessas leguminosas; e iii) estudar o efeito dos taninos na produção de gases das dietas experimentais constituídas com estas leguminosas. As dietas experimentais foram constituídas de uma dieta basal com feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp) (30 %), milho triturado (18 %) e sal mineralizado comercial (2 %) e a adição (50 %) de uma das quatro diferentes leguminosas, o que distinguiu os quatro tratamentos: ALF – alfafa, GND - feijão guandu, MCZ - mucuna cinza e MPT - mucuna preta. A análise química das leguminosas indicou que a alfafa apresentou maior teor de PB (184,86 g kg⁻¹). O feijão guandu apresentou maior teor de FDN (P<0,05) em comparação com as demais plantas investigadas. Os valores de FT, TT e TC variaram significativamente entre as espécies. A mucuna cinza apresentou maiores teores de FT, TT e TC (P<0,05) e a alfafa os menores, enquanto que a mucuna preta e o feijão guandu apresentaram valores semelhantes de FT e TT, mas o feijão guandu apresentou valores de TC maiores do que a mucuna preta. Somente a mucuna preta apresentou valores de TC considerados prejudiciais aos animais. Feijão guandu, mucuna cinza e mucuna preta apresentaram os maiores incrementos de gases com a adição do polietileno glicol (PEG), o que pode estar relacionado à atividade biológica dos taninos. As dietas experimentais GND e MCZ apresentaram os maiores incrementos de gases com a adição do PEG. A dieta experimental ALF apresentou maior incremento na produção de gases do que a leguminosa alfafa.

Palavras- chave: nutrição, incremento na produção de gases, PEG

EFFECTS OF PHENOLICS COMPOUNDS IN THE *IN VITRO* NUTRITIONAL PARAMETERS

Abstract

In the present work, it was aimed i) to characterize the leguminous plants *Medicago sativa* (alfalfa), *Cajanus cajan* (Feijão guandu), *Mucuna pruriens* (Mucuna cinza) and *Mucuna aterrima* (Mucuna preta) as for the chemical composition, quantification of tannins and the fermentation kinetics; ii) to study the effect of the tannins in the in vitro gas production of those plants; and iii) to study the effect of the tannins in the gas production of experimental diets constituted with these leguminous plants. The experimental diets were constituted of a basal diet with Tifton-85hay (*Cynodon sp*) (30%), corn grain (18%), commercial mineralized salt (2%) and the addition (50%) of one of the four different leguminous plants, what distinguished the four treatments: ALF - alfalfa, GND – Feijão guandu, MCZ - Mucuna cinza and MPT – Mucuna preta. The chemical analysis of the plants indicated that the Alfalfa presented higher crude protein content (185 g kg⁻¹ DM). The Feijão guandu presented higher NDF content (P <0.05) in comparison with the other investigated plants. The values of TF, TT and CT varied significantly among the species. The Mucuna cinza presented higher contents TF, TT and CT (P <0.05) and the Alfalfa the lowest, while the Mucuna preta and the Feijão guandu presented similar values of TF and TT, but the Feijão guandu presented higher values of CT than the Mucuna preta. Only the Mucuna preta presented values of CT considered harmful to the animals. Feijão guandu, Mucuna cinza and Mucuna preta presented the highest increments of gases with the addition of the polyethylene glycol (PEG), what can be related to the biological activity of the tannins. The experimental diets GND and MCZ presented the highest increments of gases with the addition of PEG. The experimental diet ALF presented higher increment in the gas production than the leguminous alfalfa.

Key words: nutrition, increment in gas production, PEG

4.1 INTRODUÇÃO

Para melhor utilização das leguminosas em dietas para os animais, um amplo entendimento dos efeitos positivos e/ou negativos dos compostos fenólicos presentes nestas plantas deve ser investigado. Os compostos fenólicos são provenientes do metabolismo secundário das plantas, estão ligados ao mecanismo de defesas das mesmas (BUTLER et al., 1984). Os taninos são polifenóis de ocorrência natural, em plantas, que exercem grande influência no valor nutritivo de forragens.

O uso do polietileno glicol (PEG) como um agente neutralizante dos efeitos dos taninos para melhorar o valor nutritivo de alimentos taniníferos tem sido reportado (SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001; BEM SALEM et al., 2002; MAKKAR, 2003), pois é um polímero sintético pelo qual os taninos possuem maior afinidade que pelas proteínas (KHAZAAL; ØRSKOV, 1994; MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995; GETACHEW et al., 1998; GETACHEW; MAKKAR; BECKER, 2000a; 2000b e 2001; SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001).

Os efeitos negativos dos taninos na fermentação ruminal podem ser estudados por meio da técnica *in vitro* de produção de gases, pois estes efeitos são refletidos no volume dos gases produzidos. Os resultados deste tipo de estudo são mais eficientes que a análise química dos taninos, uma vez que esta se baseia em padrões que podem representar os diferentes efeitos biológicos dos fatores antinutricionais presente nos alimentos (GETACHEW et al., 1998).

O bioensaio, metodologia desenvolvida por Makkar, Blümmel e Becker (1995a), tem como base o uso de PEG na determinação dos efeitos dos taninos condensados na produção de gases *in vitro*. A afinidade das moléculas de taninos pelo PEG resulta em acréscimos na produção de gases e, por meio de diferenças, é possível avaliar a atividade dos taninos presentes nos alimentos.

A técnica de produção de gases é bastante utilizada, sendo baseada na simulação das fermentações ruminais em frascos de vidro inoculados com microrganismos do rúmen. A produção de gases pode ser medida em tempos pré-determinados para a descrição da cinética de fermentação e, após 96 horas de incubação, o material residual é filtrado para a determinação da matéria orgânica digerida (MOD) (THEODOROU et al., 1994).

Outra possibilidade apresentada por esta metodologia é a determinação da degradabilidade da matéria seca e/ou orgânica durante a produção de gases. Isso permite que melhor se interprete a cinética fermentativa comparando a taxa de desaparecimento de material, semelhante ao que é feito pela técnica *in situ* de degradabilidade ruminal desenvolvida por Ørskov e McDonald (1979).

O modelo matemático de France et al. (1993) representa melhor o perfil sigmoidal da cinética fermentativa do que o modelo de Ørskov e McDonald (1979) por ser a técnica de produção de gases mais sensível que a técnica das sacolinhas.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as leguminosas *Medicago sativa* (alfafa) *Cajanus cajan* (feijão guandu), *Mucuna pruriens* (mucuna cinza) e *Mucuna aterrima* (mucuna preta) quanto à composição química, quantificação de taninos e a cinética de fermentação. Também se objetivou estudar o efeito dos

taninos presentes nestas plantas na produção de gases das mesmas e em dietas experimentais constituídas com estas leguminosas.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 As plantas

O feno de *Medicago sativa* (alfafa) foi comprado no comércio local. As amostras das leguminosas *Cajanus cajan* (feijão guandu), *Mucuna pruriens* (mucuna cinza) e *Mucuna aterrima* (mucuna preta), foram coletadas na Apta Regional Pólo Centro Sul. A coleta foi realizada do mesmo modo para as três leguminosas. Nas áreas de coletas, foram selecionados três pontos diferentes e nesse local o material foi coletado de cinco plantas de cada espécie, num total de 2 kg de matéria verde, para cada uma. Essa amostragem foi feita simulando o pastejo dos animais.

As amostras foram pré-secas à sombra no Laboratório de Nutrição Animal do CENA-USP e depois de secas, foram colocadas em sacos de papel, identificadas e posteriormente realizadas as análises.

Foi feita a moagem das amostras em moinho do tipo Wiley, usando peneiras de perfuração de 1 mm para as análises químicas e para a técnica *in vitro* e de 0,25 mm para a determinação de compostos fenólicos. O material moído foi armazenado em potes plásticos e em temperatura ambiente, em local arejado e escuro, para evitar a degradação dos taninos.

A alfafa foi escolhida por ser uma das mais importantes forrageiras cultivadas em termos mundiais. Possui grande adaptação agrônômica, efetividade na fixação do nitrogênio e eficiência energética de crescimento, além disso, ela pode ser fenada, ensilada e pastejada.

O feijão guandu foi escolhido, pois é muito cultivado no Brasil e se situa entre as mais importantes culturas de leguminosas, porque é capaz de produzir colheitas elevadas de sementes ricas em proteína, mesmo em solos de baixa fertilidade estando adaptada a altas temperaturas e a condições de seca.

As mucunas tanto a cinza como a preta foram escolhidas, devido à necessidade de estudos de consumo voluntário e digestibilidade, que mostrem a importância de diferentes fontes de alimentação para os animais. As mesmas são muito usadas em adubos verdes, mas eventualmente, podem ser utilizadas para produção de sementes, fibras, alimentação animal, etc.

Com base nestas leguminosas, foram formuladas dietas experimentais para serem testadas *in vitro* pela técnica de produção de gases anteriormente ao fornecimento aos animais. As dietas experimentais foram constituídas de uma dieta basal com feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp) (30 %), milho triturado (18 %) e sal mineralizado comercial (2 %) e a adição (50 %) de uma das quatro diferentes leguminosas, o que distinguia os quatro tratamentos: ALF – Alfafa (*Medicago sativa*), GND - Feijão guandu (*Cajanus cajan*), MCZ - Mucuna cinza (*Mucuna pluriens*) e MPT - Mucuna preta (*Mucuna aterrina*).

Os fenos de alfafa e Tifton-85 foram adquiridos no comércio local e também foram picados e armazenados em sacos de papel para serem analisados quimicamente.

4.2.2 Análises químicas

As quatro leguminosas (alfafa, feijão guandu, mucuna cinza e mucuna preta) foram caracterizadas quimicamente segundo a AOAC (1995) (MS – matéria seca; MM - matéria mineral; MO – matéria orgânica; e PB – proteína bruta). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo Mertens (2002). Os conteúdos de fenóis totais e taninos totais foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu e taninos condensados (proantocianidinas) pelo método butanol-HCl (MAKKAR, 2000).

4.2.3 Produção de gases e bioensaio

A técnica *in vitro* de produção de gases foi utilizada para caracterização das leguminosas com tempo de incubação de 96 h e o bioensaio (por apenas 24 h) para avaliar os efeitos dos taninos presentes nas amostras. A técnica foi conduzida de acordo com Maurício et al. (1998) e Bueno et al. (2005).

A metodologia para o bioensaio foi a mesma utilizada para a produção de gases, por um período de 24 h de incubação utilizando o polietileno glicol.

Cerca de 1 g de cada amostra foi colocado em garrafas de vidro, previamente identificadas, em quadruplicatas, sendo que em duas garrafas foi adicionado 1 g de PEG de acordo com Makkar; Blümmel; Becker (1995a). Também foram preparadas quatro garrafas sem substrato, usadas como branco

(duas com PEG e duas sem PEG).

Os parâmetros da produção de gases foram ajustados de acordo com o modelo desenvolvido por France et al. (1993).

O fator de particionamento (FP24) é também um parâmetro relativo à cinética fermentativa, descrito por Blümmel e Lebzien (2001). Este parâmetro retrata a quantidade de matéria orgânica verdadeiramente digerida (MOVD) por ml de gases produzido em determinado horário, neste caso, 24 h de incubação.

4.2.4 *Análise estatística*

A análise de variância foi realizada utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000). O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5%.

As médias corrigidas foram comparadas pelas diferenças mínimas significativas obtidas utilizando o teste Duncan para a composição química e a cinética fermentativa e o teste t de Student para a produção de gases ao nível de probabilidade de 5%.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 *Análises químicas*

Os resultados da composição química podem ser observados na Tabela 4.1. Todas as plantas estudadas apresentaram valores de PB esperados para leguminosas, sendo que a alfafa apresentou o maior valor desta fração em relação às outras leguminosas, 184,86 g kg⁻¹ MS de PB, muito próximo da literatura, 190,8 g kg⁻¹ MS de PB (BUENO, 2002).

Tabela 4.1. Composição química de feno de leguminosas

composição*	feno de leguminosas				epm
	alfafa	feijão guandu	mucuna cinza	mucuna preta	
MS	947,25 ^a	948,46 ^a	942,79 ^a	946,75 ^a	25,27
MM	81,78 ^a	49,57 ^b	74,02 ^a	67,85 ^{ab}	5,19
FDN	606,67 ^b	688,70 ^a	632,54 ^{ab}	664,77 ^{ab}	21,16
FDA	364,33 ^a	492,51 ^a	556,21 ^a	464,41 ^a	62,20
PB	184,86 ^a	142,88 ^b	156,04 ^b	163,42 ^{ab}	6,83
EE	39,47 ^a	41,64 ^a	30,64 ^{ab}	24,73 ^b	4,27
FT	10,30 ^c	29,47 ^b	51,30 ^a	24,03 ^b	2,94
TT	6,37 ^c	21,06 ^b	34,67 ^a	16,43 ^b	2,47
TC	0,20 ^c	21,43 ^b	49,63 ^a	7,27 ^c	2,62

* matéria seca (MS), g/kg de matéria fresca; cinzas, fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), em g/kg MS; fenóis totais (FT) e taninos totais (TT), em equivalente grama de ácido tânico; e taninos condensados; em equivalente grama de leucocianidina ;

^{a,b,c}. valores na mesma linha com o mesmo sobrescrito não são significativamente ($P < 0,05$; teste de Duncan) diferente

O feijão guandu apresentou valores de PB (142,88 g kg⁻¹ MS de PB) próximo dos valores encontrados por Skerman (1977) e Morton et al. (1982), entre 140 e 220 g kg⁻¹ MS de PB.

As mucunas tanto a cinza quanto a preta apresentaram valores de PB (156,04 e 163,42 g kg⁻¹ MS de PB, respectivamente) inferiores aos mencionados por Adjorlolo, Amaning-Kwarteng e Fianu (2001) (200 g kg⁻¹ MS).

O teor de FDN encontrado foi maior para o feijão guandu, e muito semelhante para as demais leguminosas. A alfafa neste trabalho apresentou 606,67 g kg⁻¹ MS de FDN, sendo maior do que o reportado por Bueno (2002)

(520,8 g kg⁻¹ MS de FDN).

As leguminosas apresentaram grande diferença significativa ($P < 0,05$) quanto aos teores de FT, TT e TC. A mucuna cinza apresentou maiores valores destes compostos em relação às demais leguminosas, a alfafa apresentou os menores valores, enquanto que a mucuna preta e o feijão guandu apresentaram valores semelhantes para FT e TT, mas o feijão guandu apresentou maior teor de TC do que a mucuna preta.

Somente a mucuna cinza demonstrou valor de TC considerado prejudicial (49,63 eq-g leucocianidina) para os ruminantes quando fornecido como única fonte de alimento. Segundo Barry, Manley e Duncan (1986) a faixa de 30 – 40 eq-g leucocianidina, o efeito é benéfico devido à proteção contra a degradação microbiana, podendo aumentar a quantidade de proteína não degradada que chega ao intestino.

4.3.2 Produção de gases

A tabela 4.2 apresenta os parâmetros relativos à cinética fermentativa das espécies de leguminosas incubadas com inóculo ruminal proveniente de ovinos alimentados com pastagem, na técnica de produção de gases ajustados pelo modelo de France et al. (1993).

Para todas as leguminosas estudadas não houve efeito entre as mesmas para a produção potencial de gases (A), e não houve efeito na ausência e na presença do PEG para este mesmo parâmetro.

Tabela 4.2. Parâmetros da cinética fermentativa de fenos de leguminosas na presença e na ausência de PEG

Parâmetro	PEG	feno de leguminosa				epm
		Alfafa	Feijão guandu	Mucuna cinza	Mucuna preta	
A	sem	178,93aA	161,75aA	163,68aA	178,08aA	6,32
	com	174,95aA	167,33aA	164,33aA	180,70aA	11,05
	epm	6,72	10,70	7,83	10,16	
b	sem	0,0276aA	0,0216bA	0,0247abA	0,0222bA	0,0014
	com	0,0294aA	0,0246aA	0,0289aA	0,0254aA	0,0022
	epm	0,0020	0,0022	0,0015	0,0015	
c	sem	-0,0546bA	-0,0237aA	-0,0263aA	-0,0350abA	0,0082
	com	-0,0523bA	-0,0286aA	-0,0281aA	-0,0417abA	0,0072
	epm	0,0085	0,0075	0,0081	0,0067	
L	sem	2,89aA	1,13aA	1,14aA	1,68aA	0,80
	com	2,28aA	1,20aA	1,20aA	1,80aA	0,71
	epm	1,00	0,64	0,80	0,50	
T _{1/2}	sem	36,94aA	39,25aA	34,87aA	40,93aA	2,91
	com	34,03aA	36,26aA	30,09aA	37,37aA	3,51
	epm	2,99	3,92	3,74	1,82	
μ _{T_{1/2}}	sem	0,0231aA	0,0197aA	0,0225aA	0,0194aA	0,0012
	com	0,0249aA	0,0222aA	0,0264aA	0,0219aA	0,0021
	epm	0,0017	0,0020	0,0020	0,0011	
DMS24	sem	335,2aB	269,8bA	288,7bB	290,2bB	10,5
	com	372,5aA	288,5cA	341,5bA	323,1bA	9,5
	epm	10,6	10,3	10,0	9,0	
DMO24	sem	326,1aB	271,5bA	298,2abB	296,5abA	11,7
	com	363,1aA	287,3cA	347,5abA	321,2bA	10,0
	epm	10,7	11,1	11,2	10,5	
DMS96	sem	532,2aA	418,7cA	458,4bA	488,7bA	11,3
	com	525,0aA	436,5bA	466,4bA	474,7bA	12,5
	epm	12,9	11,2	14,1	8,8	
DMO96	sem	535,0aA	445,9bA	468,0bA	496,9abA	16,8
	com	535,7aA	439,2cA	480,3bA	489,1bA	11,3
	epm	13,0	20,5	11,6	9,7	
FP24	sem	5,17aA	4,89aA	4,62aA	4,94aA	0,40
	com	5,29aA	4,66aA	4,77aA	4,92aA	0,38
	epm	0,52	0,32	0,38	0,30	

A: produção potencial de gases, (ml g⁻¹ MS); b e c: constantes matemáticas; L: tempo de colonização (h); T_{1/2}: tempo gasto para atingir metade do valor de A (h); μ_{T_{1/2}}: taxa de fermentação em T_{1/2}; DMS24: degradabilidade da matéria seca em 24 h ; DMO24: degradabilidade da matéria orgânica em 24 h; DMS96: degradabilidade da matéria seca em 96h; DMO96: degradabilidade da matéria orgânica em 96h; fator de partição em 24h (FP24) (mg MOVD ml⁻¹ gases em 24h)

a, b médias seguidas de letras iguais minúsculas na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P>0,05)

A, B médias seguidas de letras iguais maiúsculas na coluna, dentro de cada fator, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Duncan (P>0,05)

epm: erro padrão das médias

O tempo de colonização (L) não foi significativamente diferente entre as leguminosas e também não foi significativamente diferente na presença e na ausência do PEG. Este parâmetro relaciona-se à facilidade com que os microorganismos iniciam a degradação dos alimentos. Os valores obtidos são considerados baixos comparados com gramíneas tropicais, de acordo com Bueno et al. (2000) (7,0 a 8,3 h), mas bem semelhante ao reportado por Velásquez (2006) que se situaram entre 2,2 e 4,9 h.

Houve efeito significativo entre as amostras ($P = 0,0118$) e entre os inóculos ($P < 0,0001$), porém não houve diferença significativa com a adição do PEG ($P = 0,7477$) e também não houve diferença significativa entre as amostras e o PEG ($P = 0,8339$).

O $T_{1/2}$ é o tempo gasto para atingir metade do valor da produção potencial de gases (A). O presente estudo mostrou que as plantas não diferiram entre si quanto a este parâmetro, mas as mesmas podem ser consideradas de difícil fermentabilidade, pois os valores encontrados foram acima de 25 h, todas variaram entre 30,09 a 40,93 h.

A taxa de fermentação (μ) é calculada pelos valores matemáticos dados no modelo e varia com o transcorrer do tempo. Os dados apresentados na Tabela 4.1, mostra o valor do $\mu_{T_{1/2}}$ que é a taxa de fermentação em $T_{1/2}$. Não houve efeito para este parâmetro entre as leguminosas e não também na ausência e na presença do PEG.

A digestibilidade da MS em 24 h (DMS24) sem a presença do PEG foi maior para a alfafa e semelhante para as demais leguminosas. Com a presença do PEG a DMS24 também foi maior para a alfafa, menor para o feijão guandu e semelhante para as demais.

A digestibilidade da MO em 24 h (DMO24) sem a presença do PEG também foi maior para a alfafa, menor para o feijão guandu e semelhante para as demais. Com a presença do PEG a DMO24 também foi maior para a alfafa, semelhante para mucuna cinza e preta e inferior para o feijão guandu.

A digestibilidade da MS em 96 h (DMS96) sem a presença do PEG foi maior para alfafa, menor para feijão guandu e semelhante para as mucunas, já na presença do PEG, a DMS96 foi maior somente para a alfafa.

Novamente a alfafa apresentou maiores valores de DMO96 na ausência e na presença do PEG em relação às demais leguminosas.

O fato dos parâmetros DMS24, DMO24, DMS96 e DMO96 terem sido maiores para a alfafa, pode ser explicado devido esta leguminosa ter apresentado maior teor de PB, e menores teores de FDN e FDA em relação às demais leguminosas estudadas.

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) para a adição do PEG na produção de gases para a DMS24 para a alfafa, mucuna cinza e mucuna preta.

Houve efeito significativo ($P < 0,05$) para a presença do PEG para a DMO24 para a alfafa e mucuna cinza. Não houve efeito significativo para a adição do PEG para a DMS96 e nem para a DMO96 para nenhuma das leguminosas estudadas.

Embora a mucuna cinza tenha apresentado valores superiores de FT, TT e TC, em relação às demais leguminosas, suas DMS24, DMO24, DMS96 e DMO96 não apresentaram diferenças significativas da mucuna preta e nem do feijão guandu que foram as outras duas leguminosas taniníferas estudadas, que não apresentaram valores tão altos dos mesmos compostos fenólicos.

As variações do fator de particionamento em 24 h não foram significativas entre as plantas e não houve diferença para a adição do PEG. Estes valores foram muito próximos dos valores encontrados por Kiran e Krishnamoorthy (2006), para outras plantas, como por exemplo, o sorgo 3,98 e 4,53 MOVD ml⁻¹ gases em 24h e a soja 5,69 MOVD ml⁻¹ gases em 24h.

De acordo com a Tabela 4.3, que retrata a produção de gases das leguminosas com e sem a adição do polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação, podemos notar que para o feijão guandu, a mucuna cinza e a mucuna preta, houve efeito significativo ($P < 0,05$) da adição do PEG, exceto para alfafa, fato este que pode ser compreendido por esta apresentar baixo teor de compostos fenólicos.

Tabela 4.3. Produção de gases das leguminosas com e sem a adição do polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação

Leguminosa	S/PEG	C/PEG	Efeito
	ml g ⁻¹ MS		(%)
alfafa	54,13 ^a	55,81 ^a	3,21
feijão guandu*	47,05 ^b	51,17 ^a	8,69
mucuna cinza	51,59 ^b	57,76 ^a	12,15
mucuna preta	44,75 ^b	49,14 ^a	10,21

^{a, b} médias seguidas de letras iguais na coluna, dentro de cada fator, não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student ($P < 0,05$)

* para feijão guandu $P < 0,0560$

epm, erro padrão das médias = 1,44

O incremento na produção de gases não foi tão alto como o encontrado na literatura para algumas plantas com valores de TC semelhantes. Nozella (2006) encontrou valores de TC para a maniçoba, por exemplo, semelhantes ao feijão guandu (18,2 - 20,1 eq-g leucocianidina kg⁻¹ MS), mas o

valor do incremento na produção de gases não foi semelhante, pois o feijão guandu apresentou valores de 21,43 eq-g leucocianidina kg⁻¹ MS de TC e 8,69% de incremento na produção de gases, enquanto que a maniçoba apresentou valor de incremento de 12,3 – 17,3%. Diferentes respostas observadas no presente experimento podem ser relacionadas à atividade biológica dos taninos.

A literatura mostra que plantas contendo similares teores de taninos podem apresentar respostas variadas tanto *in vivo* como *in vitro*, e isto se deve à conformação química das moléculas, resultando em diferentes atividades biológicas (VITTI et al., 2005).

De acordo com a Tabela 4.4, que retrata a produção de gases das dietas experimentais com e sem a adição do polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação, pode-se notar que houve efeito significativo ($P < 0,05$) da adição do PEG somente para o feijão guandu e para a mucuna cinza, para a alfafa e a mucuna preta não houve efeito. O que pode ser explicado pela baixa concentração de TC nestas duas leguminosas quando comparadas às demais leguminosas estudadas.

O incremento na produção de gases foi semelhante para as leguminosas e para as dietas experimentais, diferindo somente para a alfafa, pois esta apresentou maior incremento na produção de gases na presença do PEG na análise da dieta experimental do que na análise da leguminosa.

Estes resultados corroboram para a afirmativa de que o PEG é um composto que se liga facilmente aos taninos, e pode cancelar seus efeitos adversos, disponibilizando os nutrientes, como proteína, para os microorganismos (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995b; MAKKAR, 2000).

Tabela 4.4. Produção de gases das dietas experimentais com e sem a adição do polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação

leguminosa	S/PEG	C/PEG	Efeito
	ml g ⁻¹ MS		(%)
ALF	63,99 ^a	69,12 ^a	9,18
GND	54,96 ^b	61,25 ^a	12,68
MCZ	59,70 ^b	67,34 ^a	13,91
MPT	55,71 ^a	61,18 ^a	11,26

^{a, b} médias seguidas de letras iguais na coluna, dentro de cada fator, não diferem estatisticamente entre si pelo teste t de Student (P<0,05)

* para feijão guandu P<0.0569

epm, erro padrão das médias = 2,57

Os resultados observados dos incrementos estão de acordo com os trabalhos de Getachew, Makkar e Becker (2000b), Baba, Castro e Ørskov (2002) e Vitti et al. (2005).

4.4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as leguminosas estudadas apresentaram teores esperados na composição química. A mucuna cinza apresentou quantidades de taninos condensados considerados prejudiciais aos animais. Todas as leguminosas estudadas apresentaram dificuldade na fermentabilidade ruminal, mas as leguminosas que apresentaram compostos fenólicos em sua composição química possuíam degradabilidade semelhantes. O efeito dos taninos na produção de gases das leguminosas e das dietas experimentais foi observado, o que se pode concluir que mesmo as leguminosas não apresentando teores altos

de compostos fenólicos, estes podem ser notados na atividade microbiana do rúmen, através das análises *in vitro*.

5 EFEITO DOS TANINOS NO CONSUMO VOLUNTÁRIO E DIGESTIBILIDADE EM OVINOS ALIMENTADOS COM LEGUMINOSAS TROPICAIS

Resumo

No presente trabalho, objetivou-se avaliar a utilização de dietas contendo leguminosas taniníferas na alimentação de ovinos e a possível influência dos taninos no consumo voluntário, consumo de nutrientes e na digestibilidade aparente. As dietas experimentais foram constituídas de uma dieta basal com feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp) (30 %), milho triturado (18 %) e sal mineralizado comercial (2 %) e a adição (50 %) de uma das quatro diferentes leguminosas, o que distinguia os quatro tratamentos: ALF – alfafa, GND - feijão guandu, MCZ - mucuna cinza e MPT - mucuna preta. A análise química demonstrou que as dietas ALF e GND apresentaram maiores teores de FDN. As dietas ALF, GND e MCZ diferiram estatisticamente entre si quanto a FDA. As dietas ALF, GND e MPT diferiram estatisticamente entre si quanto a PB. A dieta MCZ apresentou maior e a dieta ALF menor teor de FT, TT e TC, enquanto que as dietas GND e MPT não diferiram entre si quantos aos teores de FT e TT, mas diferiram quanto ao valor de TC, este foi maior para a dieta GND do que para a dieta MPT. Nenhuma das dietas apresentou quantidade de taninos considerada prejudicial aos animais. Embora todas as dietas tenham apresentado diferentes teores de FT, TT e TC, as mesmas apresentaram consumo voluntário e consumo de nutrientes semelhantes. Apenas a dieta ALF apresentou maior digestibilidade de PB, enquanto que a dieta MCZ a menor digestibilidade da mesma fração. Mesmo as dietas apresentando diferenças significativas em sua composição química, não houve diferença significativa entre as mesmas para a quantidade média de nutrientes digeridos diariamente.

Palavras-chaves: compostos fenólicos, nutrição, ruminantes

EFFECTS OF TANNINS IN THE VOLUNTARY INTAKE AND DIGESTIBILITY IN SHEEP FED WITH TROPICAL LEGUMS

Abstract

In the present work, it was aimed to evaluate the use of diets containing tanniferous leguminous plants in sheep feeding and the possible influence of the tannins in the voluntary intake, consumption of nutrients and in the apparent digestibility. The experimental diets were constituted of a basal diet with Tifton-85 hay (*Cynodon sp*) (30%), corn grain (18%), commercial mineralized salt (2%) and the addition (50%) of one of four different leguminous plants (*Medicago sativa* (alfalfa), *Cajanus cajan* (Feijão guandu), *Mucuna pruriens* (Mucuna cinza) and *Mucuna aterrima* (Mucuna preta)), what distinguished the four treatments: ALF - Alfalfa, GND - Feijão guandu, MCZ - Mucuna cinza and MPT – Mucuna preta. The chemical analysis demonstrated that the diets ALF and GND presented higher values of NDF. The diets ALF, GND and MCZ statistically differed among themselves in ADF content, while the diets ALF, GND and MPT statistically differed in CP content. The diet MCZ presented higher and the diet ALF lower content of TF, TT and CT, while the diets GND and MPT didn't differ amongst themselves in TF and TT content, but they differed as for the CT value, this (CT) were higher for the diet GND than for the diet MPT. None of the diets presented amount of tannins considered harmful to the animals. Although all of the diets have presented different content of TF, TT and CT, the same ones presented similar voluntary intake and consumption of nutrients. Just the diet ALF presented higher digestibility of CP, while the diet MCZ to lowest digestibility of the same fraction. Even the diets presenting significant differences in its chemical composition, there was not significant difference among them for the amount of nutrients undergone digestion daily.

Key words: phenolic compounds, nutrition, ruminant feeding

5.1 INTRODUÇÃO

As leguminosas são alimentos de representativo potencial forrageiro, e uma das características de algumas delas é a presença de fatores antinutricionais, como os taninos, por exemplo. Estes fatores são resultantes do metabolismo secundário dos vegetais e podem afetar o consumo voluntário, o consumo de nutrientes e a digestibilidade.

A caracterização nutricional das leguminosas e o estudo dos efeitos dos seus compostos fenólicos possibilitam a adequação do emprego das mesmas na alimentação animal, assim como melhor entendimento dos efeitos positivos e negativos destas moléculas na digestão dos ruminantes.

Os ovinos têm grande importância na agropecuária brasileira, portanto o estudo dos efeitos *in vivo* dos taninos em ovinos alimentados com dietas contendo leguminosas taniníferas poderá trazer benefícios para a produção destes animais e contribuir para a viabilização econômica desta exploração agropecuária.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de dietas contendo leguminosas taniníferas na alimentação de ovinos e a possível influência dos taninos no consumo voluntário, consumo de nutrientes e na digestibilidade.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local e animais

Todos os ensaios e as análises foram realizados no Laboratório de Nutrição Animal do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP).

Os animais experimentais utilizados foram oito ovinos machos adultos e castrados da raça Santa Inês com peso vivo médio de $53,3 \pm 5,12$ kg.

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a exames coproparasitológicos através da contagem de ovos por grama de fezes (opg) (Maff, 1986); seguidos de desverminações, até que fossem obtidas contagens inferiores a 200 opg. Receberam também suplementação com complexo vitamínico ADE.

5.2.2 *Período experimental*

O experimento foi composto por três períodos com duas fases cada um (ensaio de consumo voluntário e ensaio de digestibilidade). Os animais permaneceram em baias individuais durante os nove primeiros dias (três dias para adaptação e seis dias para ensaio de consumo voluntário) e depois em gaiolas metabólicas durante os cinco dias subseqüentes de cada período (ensaio de digestibilidade).

5.2.3 *Dietas*

O feijão guandu, a mucuna cinza e a mucuna preta foram produzidos na Apta Regional Pólo Centro Sul. Após 90 dias, as plantas foram colhidas e pré-secas à sombra até aproximadamente 80 % de matéria seca (MS), depois foram picadas e novamente secas à sombra até 90 % de MS. Depois dessa primeira etapa, as plantas secas foram ensacadas na forma de feno, em sacos de ráfia devidamente identificados. Um total de 200 kg de matéria seca de cada leguminosa foi coletado.

Os fenos de alfafa e Tifton-85 foram adquiridos no comércio local e também foram picados e armazenados em sacos de ráfia até o início do experimento.

As dietas experimentais foram constituídas de uma dieta basal com feno de Tifton-85 (*Cynodon* sp) (30 %), milho triturado (18 %) e sal mineralizado comercial (2 %) e a adição (50 %) de uma das quatro diferentes leguminosas, o que distinguiu os quatro tratamentos: ALF – alfafa (*Medicago sativa*), MPT - mucuna preta (*Mucuna aterrima*), MCZ - mucuna cinza (*Mucuna pruriens*) e GND - feijão guandu (*Cajanus cajan*), cuja composição química encontra-se na tabela 5.1..

Tabela 5.1. Composição química dos ingredientes utilizados para constituir as dietas experimentais

Alimento	MO	FDN	FDA	PB	EE	FT	TT	TC
Tifton-85	925	767	359	93	17	7,0	4,0	1,2
Alfafa	918	607	364	185	41	10,3	6,4	0,2
F guandu	950	689	493	143	42	29,5	21,1	21,4
M cinza	926	633	556	156	30	51,3	34,7	49,6
M preta	932	665	464	163	25	24,0	16,4	7,3
Milho	988	n.d.	56	89	66	3,1	1,9	0,0

MO: matéria orgânica (g/kg MS); aFDNom: fibra em detergente neutro (g/kg MS); FDA: fibra em detergente ácido (g/kg MS); PB: proteína bruta (g/kg MS); EE: extrato etéreo (g/kg MS); FT: fenóis totais (eq-g ácido tânico/kg MS); TT: taninos totais (eq-g ácido tânico/kg MS); TC: taninos condensados (eq-g leucocianidina/kg MS); n.d.: valor não determinado

5.2.4 Análises químicas

As quatro dietas (ALF - alfafa, GND - feijão guandu, MCZ - mucuna cinza e MPT - mucuna preta) foram caracterizadas quimicamente segundo a AOAC (1995) (MS – matéria seca; MM - matéria mineral; MO – matéria orgânica; e PB – proteína bruta). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo Mertens (2002). Os conteúdos de fenóis totais e taninos totais foram analisados pelo método de Folin-Ciocalteu e taninos condensados (proantocianidinas) pelo método butanol-HCl (MAKKAR, 2000).

5.2.5 Ensaio de consumo voluntário

Durante o ensaio de consumo voluntário de MS os animais foram mantidos em baias individuais e receberam os alimentos concentrados pela manhã (08:15 h) e os alimentos volumosos divididos em duas refeições ao dia (50 % às 08:30 h e 50 % às 16:30 h). A água foi oferecida *ad libitum*. As dietas

foram oferecidas inicialmente de acordo com o peso médio dos animais (3 % PV). O fornecimento foi ajustado de acordo com o consumo de cada animal para uma sobra diária de aproximadamente 10 % do oferecido.

Todos os dias, as sobras eram retiradas dos cochos, pesadas e secas em estufa com ventilação forçada (55 °C) por 48 h. Após a secagem, as amostras eram tiradas da estufa, pesadas e moídas em moinho do tipo Willey, passando por uma peneira com poros de 1 mm. Foram retirados 20 % das sobras moídas diariamente sendo estas armazenadas em sacos plásticos na forma de um “pool” que representava todas as coletas. Estas coletas de sobras foram feitas para o ensaio de consumo voluntário e para o ensaio de digestibilidade.

5.2.6 Ensaio de digestibilidade aparente

No ensaio de digestibilidade, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas onde receberam 90 % da quantidade média de MS consumida voluntariamente. Eles receberam todo o concentrado e, depois de 15 minutos, 50 % do volumoso às 8:30 h e os outros 50 % às 16:30 h. A água era fornecida *ad libitum*.

A urina foi coletada em baldes plásticos acoplados às gaiolas. Os baldes foram tampados com duas camadas de gaze evitando que possíveis contaminações de fezes viessem a se misturar com a urina. Foram adicionados 100 ml de uma solução de ácido sulfúrico 10 %, evitando perdas do nitrogênio por volatilização. Todos os dias, a quantidade de urina era medida, diluída para 3 litros de água, sendo colhida uma amostra de 20 ml, posteriormente armazenada a -20 °C.

As fezes foram coletadas em sacos previamente identificados diretamente acoplados às gaiolas. Estes sacos eram diariamente trocados, pesados e retirada uma sub-amostra contendo 10 % do peso total das fezes. Estas amostras eram pesadas em bandejas de alumínio e secas em estufa a 55 °C por 48 h. Depois de secas, as fezes eram retiradas da estufa, pesadas e moídas em moinho do tipo Willey, passando a amostra em peneira com poros de 1 mm. As fezes moídas foram armazenadas em sacos plásticos, em temperatura ambiente e devidamente identificados.

Para representar o oferecido, amostras das dietas foram colhidas nos três períodos (aproximadamente 300 g de feno de Tifton, 100 g de milho + sal mineral e 300 g da respectiva leguminosa).

5.2.7 Análise estatística

O delineamento deste experimento foi de um quadrado latino incompleto (4 dietas, 3 períodos e 8 animais). Para cada período foram sorteados dois animais para cada dieta, não podendo estes animais receber a mesma dieta nos períodos posteriores.

Para a análise estatística, foi utilizado o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000). O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5 %. As médias foram corrigidas e comparadas pelos erros padrões das médias (epm) e pelas diferenças mínimas significativas obtidas utilizando o teste de Duncan ao nível de probabilidade de 5 %.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Análises químicas

Os resultados das análises químicas das dietas experimentais são apresentados na Tabela 5.2..

Tabela 5.2. Composição química das dietas experimentais

componentes*	dietas				epm**
	ALF	GND	MCZ	MPT	
matéria seca (MS)	946,73 ^a	947,33 ^a	944,50 ^a	946,48 ^a	1,55
matéria orgânica (MO)	81,32 ^a	65,21 ^b	77,44 ^{ab}	74,35 ^{ab}	3,80
fibra em detergente neutro (FDN)	594,96 ^b	635,97 ^a	607,89 ^{ab}	624,01 ^{ab}	10,01
fibra em detergente ácido (FDA)	299,93 ^c	364,02 ^a	334,22 ^b	349,97 ^{ab}	6,10
proteína bruta (PB)	136,46 ^a	115,47 ^c	122,05 ^{bc}	125,74 ^b	2,86
fenóis totais (FT)	7,82 ^c	17,41 ^b	28,32 ^a	14,69 ^b	1,26
taninos totais (TT)	4,73 ^c	12,00 ^b	18,88 ^a	9,76 ^b	1,07
taninos condensados (TC)	0,46 ^c	11,08 ^b	25,18 ^a	3,99 ^c	1,31

* MS, MO, FDN, FDA e PB = valores expressos em g/kg MS; FT e TT, em eq-g de ácido tânico/kg MS; e TC eq-g leucocianidina/kg MS;

** epm: erro padrão das médias

^{a,b,c} médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas diferem entre si (P<0,05)

As dietas não diferiram (P>0,05) entre si quanto aos teores de MS.

A dieta ALF apresentou maior teor de PB, e menores de FDN e FDA, enquanto que a dieta GND apresentou exatamente o oposto. Estas diferenças foram significativas entre si (P<0,05), e as dietas MCZ e MPT apresentaram resultados semelhantes entre si destas frações. Estes resultados na composição química das dietas experimentais eram esperados, uma vez que a composição química das leguminosas que constituíam as dietas era conhecida. Conforme o demonstrado na Tabela 4.1 do capítulo anterior, a alfafa apresentou na sua composição química maior valor de PB, e menor de FDN, enquanto que o feijão guandu apresentou exatamente o oposto (P<0,05), e as leguminosas mucuna cinza e mucuna preta apresentaram resultados semelhantes entre si destas frações. Portanto o resultado da composição química das dietas está de acordo com resultados anteriores.

As dietas ALF, GND e MCZ diferiram entre si ($P < 0,05$) quanto aos teores de compostos fenólicos. A dieta MCZ apresentou os maiores teores de FT, TT e TC e a dieta ALF, os menores. As dietas GND e MPT não diferiram entre si quanto aos teores de FT e TT, mas a dieta GND apresentou maior teor de TC do que a dieta MPT ($P < 0,05$). Os resultados destes compostos fenólicos nas dietas experimentais também eram esperados, pois foram semelhantes aos resultados encontrados nas análises dos fenos destas leguminosas, o que pode ser observado na Tabela 4.1. do capítulo anterior.

Todas as dietas experimentais apresentaram teores considerados moderados com relação aos FT, TT e TC. E todas apresentaram teores de TC considerados seguro para os ruminantes (30 a 40 eq-g leucocianidina kg⁻¹ MS (BARRY; MANLEY; DUNCAN, 1986)).

O feno de mucuna cinza (Tabela 4.1.) demonstrou valor de TC considerado prejudicial para os ruminantes quando fornecido como única fonte de alimento (49,63 eq-g leucocianidina kg⁻¹ MS), mas quando esta leguminosa foi usada para constituir uma dieta, o teor de TC diminuiu, conforme pode ser observado na Tabela 5.2., fato este que pode ser explicado pela adição de outros ingredientes para a formulação da dieta, como feno de Tifton-85, milho triturado e sal mineralizado.

5.3.2 Consumo voluntário de matéria seca

Os resultados de consumo voluntário de matéria seca (CVMS) das dietas experimentais estão apresentados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Consumo voluntário de matéria seca (CVMS) das dietas experimentais (expresso em g.d⁻¹; g.kg⁻¹.d⁻¹; e g.kg^{-0.75}.d⁻¹)

CVMS	tratamentos				epm**
	ALF	GND	MCZ	MPT	
g.d ⁻¹	1091,1	950,9	1005,1	919,1	121,68
g.kg ⁻¹ .d ⁻¹	23,42	18,92	19,74	18,90	2,36
g.kg ^{-0.75} .d ⁻¹	61,13	50,33	52,61	49,82	6,09

* g.d⁻¹: gramas por dia; g.kg⁻¹.d⁻¹: gramas por quilograma de peso vivo por dia; g.kg^{-0.75}.d⁻¹: gramas por quilograma de peso metabólico por dia;

** epm: erro padrão das médias;

A presença de taninos nos fenos das leguminosas, conseqüentemente presentes também nas dietas experimentais, poderiam acarretar em diminuição no consumo voluntário. Como demonstrado na Tabela 5.2, todas as dietas apresentaram diferentes teores de FT, TT e TC, o que poderia resultar em diferenças nos resultados do consumo. Mas para este trabalho, como apresentado na Tabela 5.3, não houve diferença estatística para o CVMS ($P>0,05$), isso pode ter ocorrido devido ao coeficiente de variação ter sido alto para o CVMS (22 - 24 %).

Os valores de CVMS encontrados estão bem abaixo dos valores das tabelas de exigência do NRC (1985), que apontam para ovinos, com peso vivo médio, de 40 g kg⁻¹ d⁻¹ de CVMS. O CVMS pode estar abaixo das tabelas de exigência, devido ao curto espaço de tempo do ensaio de consumo voluntário, o tempo de adaptação à dieta pode ter sido muito pequeno. E também não pode-se descartar o fato das dietas terem apresentado taninos em sua composição química, apesar de que a dieta ALF não apresentar altas concentrações de FT, TT e TC em sua composição, mas apresentar um CVMS muito abaixo do reportado na literatura..

5.3.3 Digestibilidade aparente

O consumo de nutrientes durante o ensaio de digestibilidade aparente é apresentado na Tabela 5.4..

Se durante o ensaio de consumo voluntário, o CVMS das dietas não diferiu entre si ($P > 0,05$), durante o ensaio de digestibilidade o consumo dos nutrientes também não diferiram entre si estatisticamente. Isso pode ter ocorrido devido ao coeficiente de variação ter sido alto para o consumo dos nutrientes (31 – 40 %). Ou também pode ser explicado pelo curto espaço de tempo para a adaptação dos animais às dietas, não sendo tempo suficiente para demonstrar diferenças significativas consequentemente no consumo de nutrientes.

Tabela 5.4. Consumo de nutrientes (g d^{-1}) dos fenos de alfafa (ALF), feijão guandu (GND), mucuna cinza (MCZ) e mucuna preta (MPT) por ovinos durante ensaio de digestibilidade aparente

consumo*	tratamentos				epm**
	ALF	GND	MCZ	MPT	
matéria seca	878	700	812	724	126,8
matéria orgânica	824	666	769	685	118,6
fibra em detergente neutro	522	435	492	440	84,0
fibra em detergente ácido	26	240	309	240	53,0
proteína bruta	124	83	101	95	17,5
hemicelulose	260	195	183	200	39,2

* o consumo medido durante ensaio de digestibilidade não corresponde ao consumo voluntário, pois o nível de oferecimento da alimentação foi de 90% do CVMS

* epd: erro padrão da diferença entre as médias

médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$)

Na Tabela 5.5. são apresentados os coeficientes de digestibilidade aparente das frações das dietas.

Tabela 5.5.. Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes das dietas ALF, GND, MCZ e MPT

nutrientes	tratamentos				epm*
	ALF	GND	MCZ	MPT	
matéria seca	0,610 ^a	0,597 ^a	0,574 ^a	0,596 ^a	0,026
matéria orgânica	0,633 ^a	0,624 ^a	0,598 ^a	0,621 ^a	0,026
fibra em detergente neutro	0,561 ^a	0,518 ^a	0,533 ^a	0,515 ^a	0,040
fibra em detergente ácido	0,447 ^a	0,393 ^a	0,520 ^a	0,451 ^a	0,064
proteína bruta	0,712 ^a	0,658 ^{ab}	0,609 ^b	0,664 ^{ab}	0,026
hemicelulose	0,675 ^a	0,653 ^a	0,361 ^a	0,592 ^a	0,128

*epm: erro padrão da média

^{a, b} médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si (P<0,05)

Os coeficientes de digestibilidade de MS, MO, FDN, FDA, e hemicelulose não diferiram (P>0,05) entre as dietas.

A dieta ALF apresentou a maior e a dieta MCZ a menor digestibilidade da fração PB (P<0,05), e as dietas GND e MPT apresentaram digestibilidade semelhantes desta mesma fração (P<0,05).

A digestibilidade aparente dos nutrientes pode ser analisada pela quantidade de nutrientes digeridos diariamente (Tabela 5.6), isso é feito para detectar diferenças que poderia haver, mas que não haviam sido detectadas quando esta análise era feita somente pelos coeficientes de digestibilidade aparente.

Mesmo as dietas apresentando diferenças significativas em sua composição química (Tabela 5.2.), não houve diferença significativa entre as mesmas para a quantidade média de nutrientes digeridos diariamente.

Tabela 5.6.. Quantidade média de nutrientes digeridos diariamente ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) por ovinos alimentados com as dietas ALF, GND, MCZ e MPT

nutrientes	tratamentos				epm*
	ALF	GND	MCZ	MPT	
matéria seca	536,75 ^a	414,85 ^a	461,43 ^a	418,97 ^a	69,39
matéria orgânica	521,90 ^a	411,64 ^a	455,35 ^a	413,56 ^a	66,91
fibra em detergente neutro	294,19 ^a	230,42 ^a	262,43 ^a	216,23 ^a	46,87
fibra em detergente ácido	118,37 ^a	104,61 ^a	168,27 ^a	98,47 ^a	29,60
proteína bruta	88,87 ^a	55,69 ^a	62,13 ^a	62,18 ^a	12,43
hemicelulose	175,82 ^a	125,80 ^a	94,16 ^a	117,75 ^a	30,31

*epd: erro padrão da diferença entre as médias

médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas linhas, diferem entre si ($P < 0,05$)

Na literatura encontram-se alguns trabalhos sobre digestibilidade de dietas contendo alfafa e feijão guandu, mas nenhum contendo nutrientes semelhantes aos utilizados neste experimento. Há na literatura muitos trabalhos envolvendo as mucunas, tanto a cinza como a preta, mas estes trabalhos reportam interesse na área de adubação verde, fixação de nitrogênio, incorporação do solo, etc. Mas trabalhos como este que está diretamente relacionado à alimentação animal, são ainda mais escassos.

5.4 CONCLUSÃO

Nenhuma das dietas apresentou quantidade de taninos condensados considerado prejudicial aos animais. Todas as dietas estudadas apresentaram consumo voluntário e consumo de nutrientes semelhantes. Apenas a dieta ALF apresentou maior digestibilidade de PB, enquanto que a dieta MCZ apresentou a menor digestibilidade da mesma fração.

Estas leguminosas são uma importante fonte de nutrientes para os ruminantes, entretanto, os teores de taninos devem ser monitorados, para que não haja alteração no consumo voluntário, na fermentação ruminal e consequentemente na disponibilidade dos nutrientes aos animais.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leguminosas constituem uma importante fonte na nutrição dos ruminantes, contudo, o valor nutricional aparece como fator limitante, o que pode demonstrar um melhor entendimento dos efeitos positivos e negativos dos compostos fenólicos na nutrição dos animais. O teor de tanino condensado presente em algumas plantas deve ser monitorado, uma vez que foi observado efeito dos taninos na produção de gases e síntese microbiana *in vitro*.

As dietas experimentais contendo plantas taniníferas não alteraram o consumo voluntário, entretanto houve alteração na digestibilidade da fração protéica das dietas.

Estudos com estas leguminosas devem ser mais explorados, principalmente estudos *in vivo*, uma vez que as mesmas apresentaram teores de compostos fenólicos dentro da faixa considerada de segurança, apresentaram valores nutricionais adequados e boa qualidade na fermentabilidade ruminal. Sendo assim, pode-se considerar que este estudo evidencia novamente a busca por novas fontes de alimentação para os ruminantes, e mostra também que a simples presença de compostos fenólicos, principalmente os taninos na composição química das leguminosas, não as impede de serem utilizadas na nutrição animal.

REFERÊNCIAS

ADJORLOLO, L.K.; AMANING-KWARTENG, K.; FIANU, F.K. In vivo digestibility and effect of supplemental mucuna forage on treated rice straw degradation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 41, p. 239-245, 2001.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. **The leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation**. London: MacMillan Publishers, 1981. p. 127-128.

ALMEIDA, R.G.; EUCLIDES, V.P.B.; NASCIMENTO JUNIOR, D.; MACEDO, M.C.M.; FONSECA, D.M.; BRÂNCIO, P.A.; BARBOSA, R.A. Consumo, composição botânica e valor nutritivo da dieta de bovinos em pastos tropicais consorciados sob três taxas de lotação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 1, p. 29-35, 2003.

ANDRADE, J.M.S.; SOUZA, R.M.; VILLAÇA, H.A. Algumas considerações sobre o *Calopogonium munucoides* Desv.). **Seiva**, Viçosa, v. 30, n. 71, p. 103-107, 1970.

ARGEL, P.J.; VILLARREAL, C.M. **Nuevo mani forrajero perenne (*Arachis pintoii* Krapovickas y Gregory). Cultivar porvenir (CIAT18744): Leguminosa herbácea para alimentación animal, el mejoramiento y conservación del suelo e el embellecimiento del paisaje**. San José: Ministério de Agricultura y Ganadería de Costa Rica (MAG), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1998. 32 p. (Boletín Técnico).

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v.1, p.4/1-4/30.

BABA, A.S.H.; CASTRO, F.B.; ØRSKOV, E.R. Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implications of blocking the effects

of tannin by the addition of polyethylene glycol. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 95, p. 93–104, 2002.

BARNES, D.K.; SHEAFFER, C.C. Alfafa. In: BARNES, R.F.; MILLER, D.A.; NELSON, C.J. **Forages** – An introduction to grassland agriculture. 5. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1995. v. 1, p. 205-216.

BARRY, T.N.; MANLEY, T.R.; DUNCAN, S.J. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Site of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentrations. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 55, p. 123–137, 1986.

BEN SALEM, H.; ATTI, N.; PRIOLO, A.; NEFZAOU, A. Polyethylene glycol in concentrate or feed blocks to deactivate condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. 1. Effects on intake, digestion and growth by Barbarine lambs. **Animal Science**, East Lothian, v. 75, p. 127–135, 2002.

BLÜMMEL, M.; LEBZIEN, P. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by in vitro techniques. **Livestock Production Science**, v. 68, p. 107-117, 2001.

BOER, G.; MURPHY, J.J.; KENNELLY, J.J. Mobile nylon bag for estimating availability of rumen undegradable protein. **Journal of Dairy Science**, v.70, n.5, p.977-982, 1987.

BOGDAN, A.V. **Tropical pasture and fodder plants**. New York: Longman Inc., 1977. 475 p. (Tropical Agricultural Series).

BUENO, I.C.S. **Comparação entre técnica *in vitro* e *in situ* de avaliação de braquiária para ruminantes**. 1998. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) –

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

BUENO, I.C.S. **Cinética digestiva e síntese microbiana ruminal em ovinos alimentados com fenos de três qualidades distintas**. 2002. 97 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BUENO, I.C.S.; GOBBO, S.P.; ABDALLA, A.L.; CABRAL FILHO, S.L.S. Effect of solid phase of rumen liquor on the inoculum used for *in vitro* gas production technique. (Compact disc) In: SYMPOSIUM OF GAS PRODUCTION: FERMENTATIVE KINETICS FOR FEED EVALUATION AND ASSESS MICROBIAL ACTIVITY, 2000, Wageningen. **Proceedings...** Penicuik: BSAS-EAAP, 2000.

BUENO, I.C.S.; FILHO, S.L.S.; GOBBO, S.P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A.L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

BUTLER, L.G.; RIEDL, D.J.; LEBRYK, D.G.; BLYTT, H.J. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism, specificity and significance. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 61, n. 5, p. 916-920, 1984.

CABRAL FILHO, S.L.S.; ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; RODRIGUES, J.A.S. Ruminal fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using an *in vitro* gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 329-339, 2005.

CANNAS, A. **Taninns**: fascinating but sometimes dangerous molecules. Itaka: Cornell University, Department of Animal Science, 1999. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/tannin.html>. Acesso em: 30 mar. 1999.

CUNHA, P.G.; SILVA, D.J.; MATTOS, J.C. Feno de colônia, *Panicum maximum* Jacq., e feno de guandu, *Cajanus flavus* DC., na produção de novilhos de corte. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 33, n. 2, p. 191-200, 1976.

DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKE, D.K. Tannin analysis of food products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 24, p. 401-449, 1986.

DÖBEREINER, J.; CAMPELO, A.B. Importance of legume and their contribution to tropical agriculture. In: HARDY, R.N.; GIBSON, A.H. **A treatise, on nitrogen fixation section**. IV - Agronomy and ecology. New York: John Wiley, 1977. p. 191-220.

FERREIRA, M.B.; COSTA, N.M.S. **O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil**. Belo Horizonte: Epamig, 1979. 108 p.

FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; DAVIES, S.J.; ISAC, D. A model to interpret gas accumulation profiles with *in vitro* degradation of ruminant feeds. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 163, p. 99-111, 1993.

GETACHEW, G. **Tannins in tropical multipurpose tree species**: localization and quantification of tannins using histochemical approaches and the effect of tannins on *in vitro* rumen fermentation. Stuttgart: Verlag Ulrich E. Grauer, 1999. 186 p.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Tannins in tropical browses: Effects on *in vitro* microbial fermentation and microbial protein synthesis in media containing different amounts of nitrogen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48. p. 3581-3588, 2000a.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Tannins in Tropical Browses: Effects on *In Vitro* Microbial Fermentation and Microbial Protein Synthesis in

Media Containing Different Amounts of Nitrogen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 3581-3588, 2000b.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Effect of polyethylene glycol on in vitro degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. **British Journal of Nutrition**, London, v. 84, p. 73-83, 2000c.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Method of polyethylene glycol application to tannin-containing browses to improve microbial fermentation and efficiency of microbial protein synthesis from tannin-containing browses. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 92, p. 51-57, 2001.

GETACHEW, G.; BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 261-281, 1998.

GOBBO, S.P. **Comparações entre procedimentos laboratoriais das técnicas de produção de gases e incorporação da radiofósforo na avaliação in vitro de alimentos para ruminantes**. 2001. 44p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 256, p. 4494-4497, 1981.

HUGHES, C.E. **Leucena** – Manual de recursos genéticos. Oxford: Oxford University Press, 1998. 280 p. (Tropical Forestry Papers, 37).

IYAYI, E.A.; KLUTH, H.; RODEHUTSCORD, M. Chemical composition, antinutritional constituents, precaecal crude protein and amino acid digestibility in three unconventional tropical legumes in broilers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Germany, v. 86, p. 2166-2171, 2006.

KHAZAAL, K.; ØRSKOV, E.R. The *in vitro* gas production technique: an investigation on its potential use with insoluble polyvinylpyrrolidone for the assessment of phenolics-related antinutritive factors in browse species. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 47, p. 305-320, 1994.

KHAZAAL, K.; MARKANTONATOS, X.; NASTIS, A.; ØRSKOV, E.R. Changes with maturity in fiber composition and levels of extractable polyphenols in Greek browse: effects on *in vitro* gas production and *in sacco* dry matter degradation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 63, p. 237-244, 1993.

KIRAN, D., KRISHNAMOORTHY U. Rumen fermentation and microbial biomass synthesis indices of tropical feedstuffs determined by the *in vitro* gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science>. Acesso em: 15 fev 2007.

LEINMÜLLER, H.S.; KARL-HEINZ, M. Tannins in ruminant feedstuffs. **Animal Research and Development**, Tubingen, v. 33, p. 9-62, 1991.

LOCH, D.S.; FERGUSON, J.E. Tropical and subtropical forage seed production: a overview. In: LOCH, D.S.; FERGUSON, J.E. (Ed.). **Forage seed production**. 2. Tropical and subtropical species. New York: CABI Publishing, 1999. p. 1-40.

LONGO, C. **Avaliação do uso de *Leucaena leucocephala* em dietas de ovinos da raça Santa Inês sobre o consumo, a digestibilidade e a retenção de nitrogênio**. 2002. 62 f. Dissertação (Mestrado) –