

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

EDUARDO FERNANDO NOZELLA

**Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e  
utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**

Piracicaba  
2006

EDUARDO FERNANDO NOZELLA

**Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**

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  
Orientadora: Profa. Dra. Dorinha Miriam Silber Schmidt Vitti Kennedy

Piracicaba  
2006

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**

Nozella, Eduardo Fernando

Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos / Eduardo Fernando Nozella; orientadora Dorinha Silber Schmidt Vitti Kennedy. - - Piracicaba, 2006.

99 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Compostos fenólicos 2. Fermentação microbiana 3. Leguminosas forrageiras 4. Polietileno glicol 5. Ruminantes I. Título

CDU 633.3:591.53

## DEDICATÓRIA

À Juliana, minha esposa, aos meus pais e à minha avó Ana, pela paciência e incansável apoio ao longo do período de elaboração do presente trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Dorinha M.S.S. Vitti Kennedy, pelo incentivo e orientação no trabalho.

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Agencia Internacional de Energia Nuclear e ao British Council, por financiar os estudos através do apoio financeiro concedido.

À equipe de pesquisadores do Laboratório de Nutrição Animal do CENA, pelo incentivo.

À Profa. Dra. Maria Eunice de Queiroz Vieira, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela orientação e apoio durante a coleta das plantas.

Ao Dr. José Hugo Borges, da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola S.A. (EBDA), pela orientação na escolha das espécies.

Ao Dr. João Ambrósio Araújo Filho, do Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos – CNPC, pela orientação na escolha das espécies.

Aos colegas Sergio Lucio S. Cabral Filho, Ives C. da Silva Bueno, Sarita S. Gobbo e Patrícia B. de Godoy, pelo auxílio na condução do experimento, estímulo e amizade.

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

Aos estagiários Ana Lúcia da Silva, Bruna H. de Lamo, Priscila N. Morato, Mariana Kikuchi e Matheus A.S.L. Moneco, pela ajuda oferecida sempre que necessário.

"A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso".

John Ruskin

## RESUMO

NOZELLA, E. F. **Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos.** 2006. 99 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

As espécies nativas do semi-árido nordestino constituem uma importante fonte de proteína para o rebanho da região, especialmente durante a estação seca. Contudo, a composição química dessas plantas, especialmente teores de fibra, proteína bruta e compostos secundários, apresenta variações ao longo do ano, em função do ciclo fenológico. O conteúdo de taninos nas plantas pode variar de acordo com as condições climáticas e geográficas. Objetivou-se com o presente estudo: (i) avaliar a composição química de plantas de três Estados do nordeste brasileiro; (ii) verificar o efeito dos taninos na produção de gases; (iii) testar métodos de detanificação, para melhorar o valor nutritivo dessas plantas. O estudo foi dividido em três capítulos. No primeiro, foram avaliadas espécies nativas do semi-árido de Pernambuco, Bahia e Ceará por meio de análises químicas e técnica de produção de gases: angico - *Anadenanthera macrocarpa*, aroeira - *Astronion urundeuva*, catingueira - *Caesalpinia bracteosa*, jucazeiro - *Caesalpinia ferre*, jurema preta - *Mimosa hostilis*, leucena - *Leucaena leucocephala*, malva branca - *Sida cordifolia*, maniçoba - *Manihot pseudoglaziovii*, pau branco - *Auxemma oncocalyx* e sabiá - *Mimosa caesalpinifolia*. No segundo e terceiro capítulos, foram testados métodos de secagem e aplicação de soluções alcalinas (cinzas de madeira e hidróxido de cálcio) e de polietileno glicol para redução dos efeitos dos taninos. Os resultados obtidos pela avaliação da composição química nas três regiões demonstraram que as espécies estudadas representam uma importante reserva de forragem para os ruminantes e que o teor de compostos fenólicos deve ser monitorado, uma vez que algumas dessas espécies apresentam altos teores destes compostos. Os métodos de secagem testados não foram eficientes para minimizar a ação dos taninos e os tratamentos com soluções alcalinas e com PEG foram eficazes para reduzir a concentração dos taninos, quando medida pela análise química. O tratamento com PEG resultou uma resposta na diminuição da atividade dos taninos no bioensaio.

Palavras-chave: análises de taninos, fenóis, polietileno glicol, leguminosas tropicais, produção de gases.

## ABSTRACT

NOZELLA, E. F **Nutritional value of plants from caatinga and the use of physical and chemical treatments to reduce tannin levels** 2006. 99 f. Thesis (Doctoral) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

The typical vegetation of the semi-arid region of northeast Brazil is considered an important source of protein for the animals, mainly during the dry season. However, the chemical composition of the plants, as fiber, protein and secondary compounds change during the year with the different stage of the plants. The tannin concentration varies according to climatic and geographic conditions. The aims of this study were: (i) to evaluate the chemical composition of plants of three regions in the northeast Brazil; (ii) to verify the effect of tannins on gas production; (iii) to use detanification methods to improve the nutritional value of those plants. The study contains three chapters. In the first chapter, the following species of plants from Pernambuco, Bahia and Ceara were evaluated by chemical analysis and gas production: angico - *Anadenanthera macrocarpa*, aroeira - *Astronian urundeuva*, catingueira - *Caesalpinia bracteosa*, jucazeiro - *Caesalpinia ferre*, jurema preta - *Mimosa hostilis*, leucena - *Leucaena leucocephala*, malva branca - *Sida cordifolia*, manicoba - *Manihot pseudoglaziovii*, pau branco - *Auxemma oncocalyx* and sabia - *Mimosa caesalpinifolia*. In the second and third chapters various detanification methods were tested, as drying processes and application of alkaline solutions (wood ash and calcium hydroxide) and polyethylene glycol application. The chemical analysis showed that all the plants studied could be used as animal feed, but the phenolics contents could be a detrimental factor and should be monitored. The drying methods were not efficient to minimize tannin effects as showed using the gas production. The treatment with wood ash, calcium hydroxide and polyethylene glycol resulted in a decrease of tannins concentration, but only polyethylene glycol treatment decreased tannins activity during the gas production.

Keywords: tannin assays, phenolics, polyethylene glycol, tropical legumes, gas production.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Médias das composições químicas em $\text{g kg}^{-1}$ MS, das plantas estudadas nos três estados do nordeste brasileiro .....	39
Tabela 3.2 – Produção potencial de gases (A, $\text{ml g}^{-1}$ MS), tempo de colonização (L, h), tempo gasto para atingir metade do valor de A ( $T\frac{1}{2}$ , h), R1 e R2 após 96 h de incubação das plantas estudadas nos três estados do nordeste brasileiro .....	42
Tabela 3.3 – Bioensaio ( $\text{ml g}^{-1}$ MS) das plantas, incubadas com e sem polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação das plantas estudadas nos três estados do nordeste brasileiro .....	45
Tabela 4.1 – Médias das composições químicas em $\text{g kg}^{-1}$ MS, das plantas secas em estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ) coletadas em duas épocas do ano (chuva e seca).....	55
Tabela 4.2 – Médias das composições químicas em $\text{g kg}^{-1}$ MS, das plantas secas em estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), ao sol e à sombra, coletadas na estação chuvosa.....	59
Tabela 4.3 – Produção potencial de gases (A, $\text{ml g}^{-1}$ MS), tempo de colonização (L, h), tempo gasto para atingir metade do valor de A ( $T\frac{1}{2}$ , h), R1 e R2 das plantas secas em estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), secas ao sol e secas à sombra, coletadas na estação chuvosa.....	61
Tabela 4.4 – Bioensaio ( $\text{ml g}^{-1}$ MS) das plantas secas em estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ), secas ao sol e secas à sombra, coletadas na estação chuvosa e incubadas com e sem polietileno glicol (PEG) por 24 h.....	64
Tabela 5.1 – Médias das composições químicas em $\text{g kg}^{-1}$ MS, das plantas secas ao sol, tratadas com PEG, cinzas e cal, coletadas na época das chuvas.....	76

Tabela 5.2 – Bioensaio ( $\text{ml g}^{-1}$ MS) dos tratamentos das plantas secas ao sol, coletadas na época das chuvas incubadas com e sem polietileno glicol (PEG) por 24 h.....	79
--	----

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL .....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1	<i>Características químicas dos taninos</i> .....	15
2.2	<i>Taninos na nutrição animal</i> .....	17
2.3	<i>Métodos para inativação e/ou remoção dos taninos</i> .....	20
2.4	<i>Métodos de quantificação dos taninos</i> .....	22
2.5	<i>Produção de gases in vitro</i> .....	23
3	CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TANINOS DE PLANTAS DE TRÊS ESTADOS DO NORDESTE BRASILEIRO .....	26
	Resumo .....	26
	Abstract .....	27
3.1	INTRODUÇÃO .....	28
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	30
3.2.1	<i>Descrição da área e coleta das plantas</i> .....	30
3.2.2	<i>Análises químicas</i> .....	33
3.2.2.1	<u>Determinação de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados</u> .....	33
3.2.3	<i>Produção de gases e bioensaio</i> .....	36
3.2.4	<i>Análise Estatística</i> .....	38
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.3.1	<i>Análises químicas</i> .....	38
3.3.2	<i>Produção de gases e bioensaio</i> .....	41
3.4	CONCLUSÕES .....	46

4	<b>EFEITOS DE MÉTODOS DE SECAGENS NO VALOR NUTRICIONAL E NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TANINOS MEDIDA PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES</b> .....	47
	Resumo .....	47
	Abstract.....	48
4.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	49
4.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	50
4.2.1	<i>Local e coleta de amostras</i> .....	50
4.2.2	<i>Análises químicas</i> .....	52
4.2.3	<i>Técnica de produção de gases e bioensaio</i> .....	52
4.2.4	<i>Análises estatísticas</i> .....	53
4.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
4.3.1	<i>Análise nutricional das plantas</i> .....	54
4.3.2	<i>Efeitos dos tratamentos na composição química das plantas</i> .....	58
4.3.3	<i>Produção de gases e bioensaio</i> .....	60
4.4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
5	<b>EFEITO DOS TRATAMENTOS COM CINZAS, HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E POLIETILENO GLICOL NO VALOR NUTRICIONAL E NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TANINOS PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES</b> .....	66
	Resumo .....	66
	Abstract.....	67
5.1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	68
5.2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	70
5.2.1	<i>Local e coleta de amostras</i> .....	70
5.2.2	<i>Tratamentos</i> .....	71
5.2.2.1	<u>Tratamento com a aplicação de PEG</u> .....	71
5.2.2.2	<u>Tratamento com solução de cinzas de madeira</u> .....	72

5.2.2.3	<u>Tratamento com solução de hidróxido de cálcio</u> .....	73
5.2.3	<b>Análises químicas</b> .....	73
5.2.4	<b>Bioensaio</b> .....	73
5.2.5	<b>Análise estatística</b> .....	74
5.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	75
5.3.1	<b>Análises químicas</b> .....	75
5.3.2	<b>Bioensaio</b> .....	78
5.4	<b>CONCLUSÕES</b> .....	81
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	82
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A falta de alimentos volumosos para os rebanhos bovinos, caprinos e ovinos, durante o período de baixa precipitação pluviométrica, principalmente, em zonas áridas e semi-áridas é uma realidade que se repete todos os anos no nordeste brasileiro e em outras regiões do país. Isto reflete a baixa produtividade na exploração de ruminantes nessas zonas, causando fortes transtornos econômicos, gerando aflição e apreensão para os pecuaristas, além de causar sérios problemas sociais.

O processo de desenvolvimento econômico do semi-árido brasileiro depende do aumento das condições da produtividade da pecuária, pois, as condições climáticas não suportam, em quase toda a área, uma economia fundamentada unicamente na agricultura.

Em função dos conhecimentos adquiridos, de conceitos estabelecidos e de análises técnicas, econômicas e sociais, admite-se como verdadeiro o pressuposto de que um dos principais e mais eficazes instrumentos para auxiliar no combate à pobreza na região é a melhoria da produção pecuária, por meio da utilização racional dos recursos forrageiros nativos e exóticos adaptados.

A pecuária brasileira é caracterizada pela utilização de recursos forrageiros como fator preponderante na redução de custos da alimentação de ruminantes. Na região semi-árida, as espécies forrageiras arbustivas e arbóreas constituem-se as mais importantes fontes de alimento para o rebanho.

O interior do nordeste apresenta várias sub-regiões, como agreste, cariri e sertão, perfazendo o semi-árido nordestino. Nestas áreas, a vegetação

predominante é a caatinga, que se caracteriza por apresentar plantas de baixo ou médio porte (herbáceo-arbustivo-arbóreo), xerófilas, e, em sua maior parte, caducifólias, com predominância de leguminosas.

Os pequenos ruminantes, como caprinos e ovinos, representam uma das fontes de renda na região, e a criação é de responsabilidade de toda a família, incluindo mulheres e crianças. Poucas pesquisas têm sido feitas para a preservação e manejo das fontes locais de alimentos para os animais durante a estação seca, mesmo tendo-se conhecimento de que os caprinos utilizam extensivamente a vegetação existente (árvores e arbustos) na época das chuvas. Dados de composição química e digestibilidade das espécies arbustivas e arbóreas também são poucos. O desconhecimento dos reais potenciais forrageiros das diversas espécies nativas tem dificultado a realização de um manejo racional dos pastos naturais, o que tem concorrido para a erradicação de espécies desejáveis do ponto de vista forrageiro.

As leguminosas nativas do semi-árido nordestino constituem importante fonte de proteína para o rebanho da região, especialmente durante a estação seca. Contudo, a composição dessas plantas apresenta variações ao longo do ano, em função do ciclo fenológico, e compostos antinutricionais, como taninos, podem estar presentes nessas plantas.

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, muitas vezes, pouco conhecida. Esses compostos, quando em alta concentração, podem afetar o aproveitamento dos nutrientes pelos animais. O efeito direto desses compostos inclui a 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. O efeito adverso dos taninos pode ser minimizado pelo uso de agentes como polietileno glicol (PEG) e polivinilpirrolidona (PVPP), que formam complexos com os taninos.

O presente trabalho foi apresentado em três capítulos. O primeiro refere-se à caracterização e avaliação nutricional *in vitro* de plantas arbóreo-arbustivas de três regiões do nordeste brasileiro.

O segundo e o terceiro descrevem a aplicação de tratamentos físicos e químicos para reduzir o teor de taninos dessas plantas.

Objetivou-se com o presente estudo: (i) avaliar a composição química de plantas de três estados do nordeste brasileiro (Bahia, Ceará e Pernambuco); (ii) verificar o efeito dos taninos na produção de gases; e (iii) testar métodos de detanificação, para melhorar o valor nutritivo dessas plantas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 *Características químicas dos taninos***

Os fenóis comuns em plantas não são considerados tóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos fenóis poliméricos denominados taninos, que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SALUNKHE; CHAVAN; KADAM, 1990).

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (BUTLER et al., 1984) e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1989). Taninos são polifenóis de ocorrência natural, em plantas, que exercem grande influência no valor nutritivo de forragens. Os taninos apresentam alto peso molecular, entre 500 a 3000 Daltons (MANGAN, 1988) e contêm grupos hidroxila-fenólicos em quantidade suficiente para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (DESHPANDE; CHERYAN; SALUNKHE, 1986).

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).

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.

Nas plantas, os taninos estão localizados em vacúolos celulares nas folhas e na testa das sementes. As principais enzimas envolvidas na síntese desses compostos e armazenamento são a chalcone sintetase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonóide-3'-hidroxilase (F3'H), flavanona-3-hidroxilase (F3H), dihidroflavanol redutase (DFR), leucoantocianidina redutase (LAR), antocianidina sintetase (ANS), favanol-UDP-glicosil transferase (FGT), glutathione trans-membrana (GHS), enzima de condensação (CE), inter-vacuolar flavan-3,4-diol (LC) e flavan-3-ol transportadora (C) (AERTS; BARRY; McNABB, 1999).

Além da 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 *Taninos na nutrição animal***

Os taninos são classificados na nutrição animal como um fator antinutricional. 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 compostos fenólicos glicosilados como os flavonóides são metabolizados no rúmen por meio de hidrólise ácida ou enzimática do glicosídeo e posterior quebra do anel aromático. Os produtos da degradação dos flavonóides incluem acetato, butirato, mono e dihidroxifenólicos e floroglucinol (McSWEENEY et al., 2001).

Pesquisas foram feitas com o objetivo de estudar o valor nutritivo e o consumo voluntário de plantas típicas da flora do sertão nordestino (ARAÚJO; VIEIRA, 1987a; 1987b; 1990), e concluiu-se que os fenos de plantas nativas como a orelha de onça (*Macroptilium martii*), camaratuba (*Cratylia mollis*), jitirana (*Merremia aegyptia*) e mororó (*Bauhinia cheilantha*) poderiam servir de alimento para caprinos.

Muitos trabalhos citados na literatura mostram que quantidades moderadas de taninos condensados (10 a 40 g kg<sup>-1</sup> MS) podem prevenir o timpanismo, aumentar o fornecimento de proteína “by-pass” (proteína não degradada no rúmen) para digestão no intestino delgado, e melhorar a utilização de aminoácidos essenciais da dieta (BRANDES; FEITAS, 1992).

O complexo tanino-proteína é formado a partir da mastigação de plantas que contém taninos. Este é estável em variação de pH entre 3,5 – 7,0. Isso faz com que a proteína fique protegida da hidrólise microbiana e da deaminação no rúmen, uma vez que o pH deste órgão encontra-se geralmente nessa faixa, aumentando o

fluxo de proteína do alimento disponível para a digestão e absorção pós-rúmen (AERTS; BARRY; McNABB, 1999).

Há poucos estudos da degradação de taninos pela microbiota ruminal. Alguns dados sugerem que o ácido gálico (MURDIATI; McSWEENEY; COWRY, 1987) e oligoflavanóis podem ser degradados pelos microrganismos do rúmen (DESCHAMPS; LEBEAULT, 1985; DESCHAMPS, 1985). Os oligoflavanóis inibem as atividades proteolíticas, ureolíticas e celulolíticas do rúmen (LOHAN et al., 1983). Mueller-Harvey et al. (1987) verificaram que a atividade da celulase *in vitro* variou de 2 a 70% com a adição (ao meio de incubação) de extratos de compostos fenólicos de diversas plantas. Os resultados mostraram que taninos condensados podem reduzir a digestibilidade da fibra e alterar a cinética da fermentação de leguminosas tropicais. Esses efeitos podem ser minimizados ou eliminados pela adição do PEG (polietileno glicol).

Os efeitos adversos dos taninos incluem: redução no consumo; baixa 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, 2000b).

Os taninos 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 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 *Métodos para inativação e/ou remoção dos taninos*

Alguns métodos para inativação e/ou remoção dos taninos são indicados:

- remoção física dos taninos por extração ou moagem: através do uso de solução aquosa de álcalis ou mesmo água, na qual as plantas ou sementes são colocadas por algum tempo. A moagem das plantas ou sementes é um processo que pode auxiliar a extração dos taninos, antes do tratamento com líquido (BUTLER, 1989);
- adição de agentes como metionina ou colina na dieta de aves diminui o dano causado por produtos secundários do metabolismo dos taninos (RAYUDU et al., 1970);
- inativação dos taninos por tratamento com hidróxido ou carbonato de cálcio (SALUNKHE; CHAVAN; KADAN, 1990);
- seleção de variedades de plantas com teores mais baixos de taninos (PRICE; BUTLER, 1980).

Foram feitos esforços para melhorar a utilização das plantas taniníferas pelos os ruminantes por meio de redução do teor de tanino por tratamentos químicos, físicos ou biológicos (MAKKAR, 2003a). Uma técnica amplamente estudada é a adição de polietileno glicol (PEG), que se liga aos taninos e pode reduzir seu efeito negativo (BARRY; McNABB, 1999; PRIOLO et al., 2000; VILLALBA; PROVENZA; BANNER, 2002; MAKKAR, 2003a).

Polietileno glicol (PEG) é um polímero sintético pelo qual os taninos têm uma maior afinidade que por proteínas. O rompimento do complexo tanino-proteína aumenta disponibilidade de proteína para a microbiota do rúmen o que ocasiona

benefícios ao animal. O uso do PEG como um agente neutralizante do tanino para melhorar o valor nutritivo de alimentos taniníferos tem sido estudado (BEN SALEM et al., 2002; SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001; MAKKAR, 2003b). Embora esta técnica de incorporação de PEG seja bastante efetiva, sucesso na sua adoção por fazendeiros depende da relação de custo-benefício.

Os complexos formados com taninos e proteínas e/ou carboidratos podem ser quebrados sob condições de alta acidez ( $\text{pH} < 3,5$ ) ou alcalinidade ( $\text{pH} > 7,5$ ) (BEN SALEM; SAGHROUNI; NEFZAOU, 2005). Estudos mostraram que tratamento de plantas taniníferas com fontes alcalinas (uréia, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, etc.) e agentes oxidantes (dicromato de potássio, permanganato de potássio, etc.) diminuiu a concentração de fenóis, taninos totais e taninos condensados (RUSSELL; LOLLEY, 1989; MAKKAR; SINGH, 1992). Porém, a desvantagem principal destes tratamentos químicos foi a perda de nutrientes solúveis (BEN SALEM; SAGHROUNI; NEFZAOU, 2005).

Uma boa fonte de álcali, representada pelas cinzas de madeira, pode ser facilmente obtida em condições de campo e praticamente sem custo. Experimentos mostram que uma solução 10% de cinzas de madeira de carvalho reduziu os teores de fenóis, taninos condensados e a capacidade de precipitação de proteínas em 66, 80 e 75% em folhas de carvalho, enquanto que para as cinzas de pinus esses valores foram 69, 85 e 80%, respectivamente (MAKKAR; SINGH, 1992). O uso de soluções de cinzas tem também trazido resultados positivos no tratamento de sorgo e milho para consumo humano.

Os efeitos do armazenamento e adição de uréia foram investigados por Makkar (2001) que constatou que o tratamento dos alimentos pela adição de 4% de uréia (armazenamento a  $30^{\circ}\text{C}$  e 55% de umidade) pode levar à redução no teor de fenóis totais e taninos condensados de 88 a 100%.

A secagem de folhas de carvalho sob diferentes condições (90°C por 24 h, 60°C por 48 h, secagem à sombra por 24, 48 ou 72 h e secagem ao sol por 24 ou 48 h), não teve efeitos nos níveis de fenóis totais, taninos condensados e na capacidade de precipitação de proteínas. Entretanto, para folhas de mandioca e de leucena, a secagem a 90°C por 24 h reduziu o conteúdo de taninos (MAKKAR, 2001).

#### **2.4 Métodos de quantificação dos taninos**

A quantidade e o tipo de tanino sintetizado pelas plantas variam consideravelmente, dependendo da espécie da planta, dos cultivares, do tecido, do estágio de desenvolvimento e das condições ambientais. Portanto, os estudos dos efeitos nutricionais dos taninos, em animais, exigem a quantificação dos taninos presentes na dieta. 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).

As amostras para determinações de taninos devem ser de preferência frescas e transportadas em baixa temperatura (no gelo ou dióxido de carbono) e devem ser secas ao ar (à sombra) ou, nos trópicos úmidos, recomenda-se logo após

a coleta, a pré-secagem das amostras em estufa a temperatura de 40°C (MUELLER-HARVEY, 2001).

Outros métodos para a determinação de taninos incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC, na sigla em inglês), métodos de ligação e precipitação com proteínas. A dificuldade dessas análises e suas interpretações ocorrem porque a maioria dos métodos mede taninos não em termos absolutos, mas em relação a padrões, por exemplo, ácido tânico ou ácido gálico.

A extração dos taninos dos tecidos vegetais é difícil porque eles podem estar ligados a carboidratos, proteínas, parede celular ou são insolúveis (SALUNKHE; CHAVAN; KADAN, 1990).

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 efeitos dos taninos na fermentação no rúmen (GETACHEW, 1999).

## **2.5      *Produção de gases in vitro***

A técnica de produção de gases é 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).

Algumas metodologias foram criadas para a utilização da técnica de produção de gases, com o uso de seringas de vidro, ou garrafas de vidros, ou ainda utilizando aparelhos mais sofisticados. A base desta técnica é a mesma, independente da metodologia usada. Certa quantidade de amostra é colocada em um recipiente hermeticamente fechado, contendo uma solução tampão, uma solução de macro e micro-minerais e um inóculo (microrganismos ruminais) (BUENO, 1998).

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).

Alguns modelos matemáticos são utilizados para expressar os dados da cinética fermentativa, sendo que os mais comumente usados nos trabalhos científicos são o de Ørskov e McDonald (1979) e o de France et al. (1993). O modelo 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.

A técnica de produção de gases *in vitro*, para estudos da ação de fatores antinutricionais, apresenta várias vantagens sobre outros métodos como a digestibilidade *in situ* ou *in vitro* que são baseados na determinação gravimétrica de resíduos (GETACHEW et al., 1998).

A produção de gases tem sido utilizada por muitos pesquisadores, com a finalidade de estudar o efeito de algumas forrageiras que possuem fatores

antinutricionais na fermentação ruminal e digestibilidade da matéria seca. A utilização desta metodologia com a adição de agentes ligantes de taninos, como o polietileno glicol, para avaliar os efeitos dos taninos nos processo digestivo dos ruminantes vem sendo estudada por vários pesquisadores (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995a; GETACHEW; MAKKAR; BECKER, 2000a).

### 3 CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TANINOS DE PLANTAS DE TRÊS ESTADOS DO NORDESTE BRASILEIRO

#### Resumo

No presente trabalho objetivou-se (i) avaliar a composição química de plantas (angico - *Anadenanthera macrocarpa*, aroeira - *Astronion urundeuva*, catingueira - *Caesalpinia bracteosa*, juazeiro - *Caesalpinia ferre*, jurema preta - *Mimosa hostilis*, leucena - *Leucaena leucocephala*, malva branca - *Sida cordifolia*, maniçoba - *Manihot pseudoglaziovii*, pau branco - *Auxemma oncocalyx* e sabiá - *Mimosa caesalpinifolia*) de três estados do nordeste brasileiro (Pernambuco, Bahia e Ceará); (ii) verificar o efeito dos taninos na produção de gases. Polietileno glicol (PEG) foi adicionado ao meio de fermentação (1 g PEG 6000 g<sup>-1</sup> substrato) para avaliar os efeitos dos taninos na produção de gases. Observou-se grande variação na composição química, nos compostos fenólicos e na produção de gases nas plantas estudadas. A análise química indicou que todas as amostras apresentaram alto conteúdo de PB (102,4 a 197,3 g kg<sup>-1</sup>). Malva branca e pau-branco foram as plantas que apresentaram teores mais altos de FDN (P<0,05) em comparação com as outras plantas investigadas. Os resultados mostraram que a concentração de fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e taninos condensados (TC) variaram significativamente entre as espécies. O conteúdo de TC na catingueira, juazeiro, malva branca e pau branco foram baixos, dentro da faixa considerada segura para os animais (30 a 40 eq-g leucocianidina kg<sup>-1</sup>MS). Aroeira e jurema preta apresentaram teores de FT, TT e TC elevados. Angico, aroeira, jurema preta e sabiá apresentaram os maiores incrementos de gases com a adição do polietileno glicol (PEG), o que pode estar relacionado à atividade biológica dos taninos. Os aumentos de porcentagem de produção de gases na presença de PEG variaram de -1,9 a 131,1%. O pequeno efeito do PEG na produção de gases para catingueira, juazeiro, malva branca e pau branco, foi provavelmente, devido à baixa concentração de TC nessas plantas. Nas três regiões estudadas as plantas apresentaram alto teor em PB e algumas espécies tiveram conteúdo de compostos fenólicos considerado prejudicial aos animais.

Palavras-chave: caatinga, forrageiras, antinutricional, produção de gases, polietileno glicol.

## NUTRITIONAL CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF TANNINS BIOLOGICAL ACTIVITY OF BROWSES FROM THREE BRAZILIAN NORTHEAST STATES

### Abstract

The aims of the present study were: (i) to evaluate the chemical composition of plants of northeast of Brazil. The plants studied were: angico - *Anadenanthera macrocarpa*, aroeira - *Astronion urundeuva*, catingueira - *Caesalpinia bracteosa*, jucazeiro - *Caesalpinia ferre*, jurema preta - *Mimosa hostilis*, leucena - *Leucaena leucocephala*, malva branca - *Sida cordifolia*, maniçoba - *Manihot pseudoglaziovii*, pau branco - *Auxemma onocalyx* and sabiá - *Mimosa caesalpinifolia* and they were collected from Pernambuco, Bahia and Ceará states; (ii) to study the effect of tannins on gas production. Polyethylene glycol (PEG) was added to the fermentation medium (1 g PEG 6000 g<sup>-1</sup> substrate) to evaluate the effects of tannin on gas production. A wide variation on chemical composition and gas production was observed. All the plants had high crude protein (CP) content (102.4 a 197.3 g kg<sup>-1</sup>). Malva branca and pau branco showed the highest values of neutral detergent fiber (NDF) (P<0.05). Total phenol (TP), total tannins (TT) and condensed tannins (CT) showed a large variation among species. CT content of catingueira, jucazeiro, malva branca and pau branco was within the range considered as safe for animal nutrition (30 a 40 eq-g leucocyanidin kg<sup>-1</sup>MS). TP, TT and CT were high for aroeira and jurema preta. The highest increases on gas production with PEG were for angico, aroeira, jurema preta and sabiá indicating high tannin bioactivity. Catingueira, jucazeiro, malva branca and pau branco showed low CT content and low effect of PEG on gas production. The plants in the three regions presented high CP content and some species showed high concentration of phenolics.

Keywords: caatinga, forage, anti-nutritional, gas production, polyethylene glycol.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A utilização de folhas de árvores e arbustos como alimento para animais é uma prática comum que tem crescido nos últimos anos. O reconhecimento do potencial de folhas de árvores para produzir quantidades consideráveis de biomassa de alto teor protéico tem conduzido ao desenvolvimento de sistemas de pecuária que integram o uso de folhas de árvores e arbustos com outros alimentos mais convencionais. Folhas e arbustos têm sido fontes de alimento de alta qualidade para ruminantes, especialmente como fontes de proteína e energia em condições severas e áridas (OTCHERE; NURU, 1988; AHN et al., 1989; DEVENDRA, 1990).

A vegetação nativa do nordeste brasileiro, denominada caatinga, é composta de plantas xerófilas, lenhosas, decíduas, em geral espinhosas, com um padrão de arbóreo a arbustivo ou herbáceo estacional (VASCONCELOS, 1997). Por sua abundância e resistência à seca, essa vegetação tem sido historicamente utilizada para alimentação animal, constituindo, muitas vezes, a única fonte de proteína e energia para os animais da região. Cerca de 70% das espécies lenhosas de alguns sítios ecológicos participam da dieta de bovinos, caprinos e ovinos (ARAÚJO FILHO; GADELHA; SOUZA, 1993).

Apesar do seu potencial como recurso de alimento para ruminantes, a maioria dos arbustos tropicais contém níveis altos de fatores antinutricionais como os taninos. Em teores elevados, os taninos podem ter efeitos prejudiciais, reduzindo a aceitabilidade, pelos animais, o consumo e a digestibilidade (WAGHORN et al., 1987; SALUNKHE; CHAVAN; KADAM, 1990; KUMAR; D'MELLO, 1995).

Taninos são compostos polifenólicos que ocorrem nas plantas e que

possuem a habilidade de formar complexos com proteínas, carboidratos e outros nutrientes (LOWRY; McSWEENEY; PALMER, 1996). A formação de complexos, especialmente com proteínas, leva à menor absorção de nutrientes, agravando ainda mais o quadro de deficiência nas regiões tropicais.

Os principais efeitos negativos encontrados por Lemmüller; e Karl-Heinz (1991), em estudos *in vitro*, foram no metabolismo dos carboidratos (diminuição dos ácidos graxos voláteis, da digestibilidade da matéria orgânica e da produção de gases) e no metabolismo das proteínas (redução dos conteúdos de amônia, inibição de atividade da urease e da proteólise da caseína).

Os efeitos negativos 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 podem ser mais eficientes que a análise química dos taninos, pois este se baseia em padrões que podem apresentar efeitos biológicos diferentes dos fatores antinutricionais presente nos alimentos. (GETACHEW et al., 1998).

O polietileno glicol (PEG) é um polímero sintético pelo qual os taninos têm uma afinidade mais alta que pelas proteínas. O uso de PEG como um agente neutralizante dos efeitos dos taninos para melhorar o valor nutritivo de alimentos taniníferos tem sido reportado (BEN SALEM et al., 2002; SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001; MAKKAR, 2003b).

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.

Os objetivos deste trabalho foram (i) investigar a composição química e a cinética de fermentação de várias plantas de três estados do nordeste brasileiro; e (ii) estudar os efeitos da adição de PEG para minimizar a ação dos taninos no processo fermentativo.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 *Descrição da área e coleta das plantas***

Foram coletadas plantas de três estados do nordeste brasileiro: Pernambuco, Bahia e Ceará. As descrições das áreas de coletas e da amostragem feita encontram-se a seguir:

#### **Pernambuco**

As coletas das amostras foram realizadas na região semi-árida (Agreste) do Estado de Pernambuco (latitude 8°4'S e longitude 34°53'O), no Centro de Treinamento e Profissionalização em Caprino-Ovinocultura de Sertânia, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), no município de Sertânia. Esta região apresenta duas estações distintas, baseadas na precipitação anual: a estação de inverno (período das chuvas), com duração de 3 a 5 meses, que ocorre entre abril e agosto e a estação de verão (período da seca), com duração de 7 a 9 meses, mas que pode se prolongar por 18 meses ou mais. As chuvas, quando ocorrem, são

geralmente torrenciais e irregulares. Embora o nível de precipitação, em valores absolutos, não seja muito baixo (300 – 600 mm/ano), as altas taxas de evaporação (2000 mm/ano) causam balanço negativo de água. A umidade relativa do ar é, em média, de 50% e a temperatura média anual oscila entre 25 e 34°C.

Estas coletas foram feitas em abril de 2002 (estação chuvosa) e as espécies coletadas foram: angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) e maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*).

### **Bahia**

As plantas foram coletadas no semi-árido (Agreste) do Estado da Bahia (latitude 09°24'S e longitude 40°26'O), na Estação Experimental de Caraíbas. A precipitação média nessa região é de 512 mm e a época chuvosa dura 3 a 6 meses, entre janeiro e junho. A umidade relativa do ar é de aproximadamente 62%. A temperatura dessa região oscila entre 21,0°C e 32,5°C (média 26,5°C).

As amostragens foram realizadas no período das chuvas (abril-2003) e foram coletadas cinco espécies com potencial forrageiro: catingueira (*Caesalpinia bracteosa*); jurema preta (*Mimosa hostilis*); leucena (*Leucaena leucocephala*); malva branca (*Sida cordifolia*) e maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*).

### **Ceará**

As amostras foram coletadas no Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos (EMBRAPA-Caprinos), na região semi-árida (Agreste) de Estado de Ceará, (latitude 3°72' S e longitude 40°39' O), na Estação Experimental de Sobral. A média pluviométrica nesta região é de 722 mm, o que corresponde a 95,15% da média total

do ano. A umidade relativa do ar é de aproximadamente 69%. A temperatura dessa região oscila entre 25°C e 35°C (média de 28°C).

As amostras foram coletadas no período das chuvas (abril-2004). Cinco espécies com potencial forrageiro foram selecionadas: catingueira (*Caesalpinia bracteosa*); jucazeiro (*Caesalpinia ferrea*); jurema preta (*Mimosa hostilis*); pau branco (*Auxemma oncocalyx*) e sabiá (*Mimosa caesalpinifolia*).

### **Coleta de amostras**

A coleta das amostras foi realizada do mesmo modo nas três regiões. Nas áreas de coletas foram selecionados três pontos diferentes e nesses locais o material foi coletado de cinco plantas de cada espécie, num total de aproximadamente 3 kg de matéria verde, para cada uma. A amostragem foi feita simulando o pastejo dos animais, sendo coletadas as folhas e ramos com no máximo 6 mm de espessura. As árvores apresentavam altura aproximada de 2 m.

As amostras foram secas em estufa a 40°C, com circulação de ar forçada por 48 h. Todo o processo de secagem foi realizado no próprio local de trabalho, sendo que por várias vezes as plantas foram revolvidas para uma secagem homogênea.

Depois de realizada essa primeira etapa, as amostras foram colocadas em sacos de papel, identificadas e transportadas para o Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), em Piracicaba, SP, onde foram realizadas as análises.

Foi feita a moagem das amostras em moinho Wiley, usando peneiras de perfuração de 1 mm para as análises químicas e para a técnica *in vitro* e de 0,25 mm para determinação de compostos fenólicos. O material moído foi armazenado em

potes plásticos e armazenado em temperatura ambiente, em local arejado e escuro, para evitar a degradação dos taninos.

Essas plantas foram selecionadas porque estudos anteriores mostraram que são importantes fontes alimentares para caprinos e ovinos na caatinga (ARAÚJO FILHO, 1990; BARROS; SOUZA; ARRUDA, 1997; ARAÚJO FILHO; CARVALHO, 1998).

### **3.2.2 Análises químicas**

As plantas foram caracterizadas quimicamente segundo a A.O.A.C. (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 descrição 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 ultra sônico (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.

### ***Curva padrão e reagentes para determinação de fenóis e taninos totais***

A curva padrão (Quadro 3.1) para fenóis e taninos foi feita utilizando-se solução padrão de ácido tânico (Merck) – 0,1 mg ml<sup>-1</sup> e a leitura foi feita em espectrofotômetro, em absorbância, a 725 nm.

Quadro 3.1 – Curva padrão de ácido tânico

Tubo	Padrão (μl)	Água destilada (μl)	Reagente Folin Ciocalteu (μl)	Solução de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (ml)	Ácido tânico (μg)
T0	0	500	250	1,25	0
T1	20	480	250	1,25	2
T2	40	460	250	1,25	4
T3	60	440	250	1,25	6
T4	80	420	250	1,25	8
T5	100	400	250	1,25	10

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<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) foi preparada a partir de solução contendo 18,53 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 na qual os resultados ficaram na faixa mediana da curva padrão.

Em tubos de ensaio, foram adicionados: 50 µl do sobrenadante 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 ×g por 10 min a 4°C (centrífuga IEC CENTRA – 7R) e o sobrenadante foi coletado. Do sobrenadante, 100 µl foram pipetados em tubos de ensaio (em duplicata), e aos tubos foram adicionados 400 µl de água destilada, 250 µl 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, 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.

Decorrido o tempo necessário, os tubos foram esfriados e as leituras foram feitas através de espectrofotômetro em absorvância a 550 nm. Os valores de taninos condensados, expressos como equivalente-grama de leucocianidina kg<sup>-1</sup> MS foram calculados pela fórmula:

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

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) (THEODOROU et al., 1994). A quantidade de gases foi estimada através da fórmula:  $V=0,1171p^2+4,7659p$  (NOZELLA et al., 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.

O bioensaio foi feito para avaliar os efeitos dos taninos nas plantas utilizando-se 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. 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 *Análise estatística***

Os resultados das análises de caracterização química, da produção de gases e do bioensaio das plantas foram submetidos a delineamento estatístico inteiramente casualizado, tendo como fonte de variação as cinco plantas em triplicata (n = 15).

Os resultados referentes aos teores de FT, TT, TC e ao incremento de gases foram analisados após transformação logarítmica [ $\log(x+10)$ ]. 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 das análises químicas das plantas avaliadas nas três regiões estão apresentados na Tabela 3.1. Observa-se que para as plantas, nas três regiões, houve uma grande variação na composição química.

Tabela 3.1 – Médias das composições químicas em g kg<sup>-1</sup> MS, das plantas estudadas nos três estados do nordeste brasileiro

Regiões	Plantas	PB	FDN	FDA	FT*	TT*	TC**
Pernambuco	angico	102,4 <sup>c</sup>	486,0 <sup>bc</sup>	239,8 <sup>b</sup>	119,4 <sup>b</sup>	111,2 <sup>b</sup>	11,3 <sup>d</sup>
	aroeira	108,3 <sup>c</sup>	440,7 <sup>bc</sup>	327,2 <sup>ab</sup>	171,9 <sup>a</sup>	157,2 <sup>a</sup>	29,4 <sup>b</sup>
	jurema preta	160,8 <sup>a</sup>	556,7 <sup>ab</sup>	428,8 <sup>a</sup>	156,6 <sup>a</sup>	140,2 <sup>a</sup>	49,0 <sup>a</sup>
	malva branca	115,0 <sup>bc</sup>	649,1 <sup>a</sup>	341,9 <sup>ab</sup>	11,4 <sup>d</sup>	7,9 <sup>d</sup>	0,1 <sup>e</sup>
	maniçoba	135,4 <sup>b</sup>	401,5 <sup>c</sup>	306,3 <sup>b</sup>	41,8 <sup>c</sup>	33,6 <sup>c</sup>	18,2 <sup>c</sup>
	EP	7,96	45,36	33,70	7,25	6,91	2,76
Bahia	catingueira	138,8 <sup>c</sup>	468,9 <sup>b</sup>	277,4 <sup>b</sup>	129,5 <sup>ab</sup>	125,0 <sup>ab</sup>	0,8 <sup>c</sup>
	jurema preta	141,8 <sup>c</sup>	438,4 <sup>b</sup>	289,7 <sup>b</sup>	174,3 <sup>a</sup>	148,3 <sup>a</sup>	60,3 <sup>a</sup>
	leucena	197,3 <sup>a</sup>	490,0 <sup>b</sup>	293,4 <sup>b</sup>	110,8 <sup>b</sup>	95,1 <sup>b</sup>	66,5 <sup>a</sup>
	malva branca	114,9 <sup>d</sup>	731,6 <sup>a</sup>	405,8 <sup>a</sup>	15,4 <sup>d</sup>	10,7 <sup>d</sup>	0,3 <sup>c</sup>
	maniçoba	172,7 <sup>b</sup>	476,3 <sup>b</sup>	356,3 <sup>ab</sup>	50,4 <sup>c</sup>	40,3 <sup>c</sup>	20,1 <sup>b</sup>
	EP	6,69	24,28	28,78	11,44	10,79	7,86
Ceará	catingueira	142,1 <sup>a</sup>	598,0 <sup>b</sup>	298,2 <sup>c</sup>	153,9 <sup>b</sup>	149,5 <sup>ab</sup>	4,2 <sup>b</sup>
	jucazeiro	152,0 <sup>a</sup>	585,3 <sup>b</sup>	352,5 <sup>bc</sup>	130,1 <sup>b</sup>	125,0 <sup>b</sup>	1,3 <sup>b</sup>
	jurema preta	148,0 <sup>a</sup>	636,0 <sup>a</sup>	440,5 <sup>b</sup>	283,5 <sup>a</sup>	217,8 <sup>a</sup>	94,5 <sup>a</sup>
	pau branco	156,8 <sup>a</sup>	673,0 <sup>a</sup>	433,6 <sup>b</sup>	52,9 <sup>c</sup>	42,9 <sup>c</sup>	0,2 <sup>b</sup>
	sabiá	162,2 <sup>a</sup>	698,9 <sup>a</sup>	565,5 <sup>a</sup>	155,2 <sup>b</sup>	110,5 <sup>b</sup>	121,8 <sup>a</sup>
	EP	13,66	19,67	27,48	19,67	17,23	14,59

\* fenóis totais (FT) e taninos totais (TT), em equivalente-grama ácido tânico kg<sup>-1</sup> MS; \*\* tanino condensado, em equivalente-grama leucocianidina kg<sup>-1</sup> MS;

<sup>a,b,c,d</sup> para cada região, médias seguidas por sobrescritos diferentes, nas colunas, diferem entre si (teste Duncan, P<0,05)

EP, erro padrão das médias

Os valores de FDN e FDA apresentaram diferenças estatísticas (P<0,05) nas três regiões. Esses valores foram superiores aos encontrados na literatura para o mesmo período (março-abril) (BEELEN, 2002; VASCONCELOS, 1997). As diferenças podem ter sido causadas pela formação de complexos taninos-proteína,

que não sendo solubilizados durante a análise de FDN, podem ter levado à superestimação do conteúdo em parede celular (TERRILL et al., 1994).

Shayo e Udén (1999) observaram também em espécies arbóreas, usadas na alimentação animal e coletadas no período das chuvas, altos teores de FDN e FDA.

Os teores de PB nos três estados variaram de 102,4 a 197,3 g kg<sup>-1</sup> MS. Os conteúdos em PB foram elevados (maiores que 100 g kg<sup>-1</sup> MS) para todas as plantas e foram semelhantes aos observados por Rittner e Reed (1992) e Hove et al. (2001).

Em Pernambuco, a jurema preta apresentou teor de PB de 160,8 g kg<sup>-1</sup> MS, destacando-se das demais (P<0,05). No Estado da Bahia, os teores de PB para leucena e maniçoba foram os mais elevados (197,3 e 172,7 g kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente). No Ceará não houve diferenças entre o conteúdo de PB entre as plantas e o valor médio foi de 152,2 g kg<sup>-1</sup> MS.

Os resultados deste estudo e os observados por Rittner e Reed (1992) e por Makkar e Becker (1998) mostram que espécies tropicais apresentam altos teores de PB e que podem ser usadas para suplementar animais em pastagens de baixa qualidade.

Houve diferenças relativamente grandes entre as espécies quanto à concentração de compostos fenólicos para as três regiões (Tabela 3.1).

Amostras de malva branca coletadas em Pernambuco e na Bahia apresentaram os teores mais baixos de FT, TT e TC. A jurema preta, nas três regiões, foi a planta que teve maior concentração de compostos fenólicos, principalmente no Ceará. A maniçoba apresentou teores considerados moderados com relação aos FT, TT e TC.

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  $\text{kg}^{-1}$  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 jurema preta, leucena e sabiá representam certo risco para os animais, quando fornecidas como uma única fonte de alimento.

Os resultados de FT, TT e TC encontrados por Vitti et al. (2005) para leucena coletada na região de Piracicaba, estão bem abaixo (25,7 e 21,6 eq-g ácido tânico  $\text{kg}^{-1}$  MS para FT e TT, respectivamente e 12,7 eq-g leucocianidina  $\text{kg}^{-1}$  MS para TC) daqueles observados na leucena da Bahia, o que pode estar refletindo principalmente as diferentes condições de solo e clima entre as duas regiões.

### **3.3.2 *Produção 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), tempo de colonização (L), tempo gasto para atingir metade do valor de A ( $T_{1/2}$ ), R1, razão entre a produção acumulada de gases após 48 e 96 h de incubação (G48 e G96, respectivamente) e R2, razão entre a produção de gases após G96 e a produção potencial de gases (A).

Tabela 3.2 – Produção potencial de gases (A, ml g<sup>-1</sup> MS), tempo de colonização (L, h), tempo gasto para atingir metade do valor de A (T<sup>1/2</sup>, h), R1 e R2 após 96 h de incubação das plantas estudadas nos três estados do nordeste brasileiro

Regiões	Plantas	A	L	T <sup>1/2</sup>	R1	R2
Pernambuco	angico	102,2 <sup>c</sup>	2,46 <sup>ab</sup>	39,9 <sup>bc</sup>	0,68 <sup>b</sup>	0,88 <sup>a</sup>
	aroeira	108,8 <sup>c</sup>	1,96 <sup>ab</sup>	54,1 <sup>ab</sup>	0,61 <sup>bc</sup>	0,75 <sup>b</sup>
	jurema preta	67,3 <sup>d</sup>	4,17 <sup>a</sup>	62,8 <sup>a</sup>	0,55 <sup>c</sup>	0,70 <sup>b</sup>
	malva branca	139,7 <sup>b</sup>	3,50 <sup>ab</sup>	24,1 <sup>c</sup>	0,86 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>
	maniçoba	179,2 <sup>a</sup>	1,31 <sup>b</sup>	27,1 <sup>c</sup>	0,79 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>
	EP	8,40	0,668	5,35	0,028	0,037
Bahia	catingueira	120,8a	0,80a	33,6ab	0,73b	0,90ab
	jurema preta	84,4b	2,05a	42,2a	0,66b	0,84b
	leucena	125,6a	1,72a	38,7a	0,72b	0,87ab
	malva branca	112,7a	1,65a	19,4b	0,90a	0,99a
	maniçoba	122,7a	1,98a	21,3b	0,88a	0,99a
	EP	6,12	0,563	5,25	0,03	0,04
Ceará	catingueira	126,1a	0,82a	32,1b	0,73bc	0,89ab
	jucazeiro	105,2b	2,58a	36,3b	0,71c	0,85b
	jurema preta	52,6c	0,79a	26,0b	0,79ab	0,95ab
	pau branco	57,5c	1,10a	59,1a	0,57d	0,73c
	sabiá	34,8d	1,84a	22,5b	0,84a	0,98a
	EP	3,13	0,773	4,47	0,025	0,034

<sup>a,b,c,d</sup> para cada região, médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem entre si (teste de Duncan, P<0,05)

EP, erro padrão das médias

A produção potencial de gases (A) apresentou diferenças significativas (P<0,05) entre as plantas para as três regiões.

A jurema preta, para os três locais estudados, apresentou baixa produção potencial de gases (P<0,05) em relação às demais plantas estudadas em cada região. No Ceará, o pau branco e sabiá também resultaram em baixa produção potencial de gases. Catingueira, malva branca e maniçoba foram as plantas que apresentaram os maiores valores de produção potencial de gases nas regiões em que foram estudadas.

Os resultados mostram que os efeitos dos compostos fenólicos na PG são complexos, variam entre espécies de plantas, e que os taninos presentes nas plantas podem ser mais importantes que as fibras, limitando a fermentação *in vitro*. e Larbi et al. (1998) observaram correlação positiva entre o conteúdo de PB e a taxa de PG e correlação negativa entre FDN ou FDA e a taxa de PG. O efeito negativo do conteúdo de parede de celular na PG pode ser pela redução da atividade microbiana por aumentar as condições adversas do meio com o progresso da incubação.

Os baixos potenciais de produção de gases da jurema preta e do sabiá podem ser relacionados aos elevados teores de taninos, conforme mostrado na Tabela 3.1. Os taninos presentes nessas plantas poderiam estar ligados a carboidratos ou causarem inibição de enzimas ou microrganismos (GRIFFITHS, 1986), levando à baixa produção potencial de gases. Já, a baixa produção potencial de gases obtida para o pau branco poderia estar relacionada com os teores elevados em FDN e FDA (Larbi et al., 1998), pois as concentrações de FT, TT e TC são consideradas baixas.

O tempo de colonização não foi significativamente diferente entre as espécies, exceto para jurema preta e maniçoba em Pernambuco. Este parâmetro relaciona-se à facilidade com que os microrganismos 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). Isto evidencia que essas plantas possuem alguma fonte de energia prontamente disponível (carboidratos solúveis).

Os parâmetros R1 e  $T_{1/2}$  foram introduzidos para compreender e comparar os alimentos do ponto de vista fermentativo. O R1 representa proporcionalmente quanto da produção total de gases determinada no ensaio (96 h) foi realizada até

48 h de incubação e o  $T_{1/2}$  mostra o tempo gasto para atingir metade do valor da produção potencial de gases (A). Sendo assim, assumindo-se uma taxa de escape ( $k_e$ ) teórica de  $0,0208 \text{ h}^{-1}$ , o tempo médio de retenção no rúmen seria de aproximadamente 48 h. Portanto, seria desejável que a maior parte da fermentação ocorresse dentro desse período, ou seja, o R1 deveria ser o mais próximo de 1 e os valores de  $T_{1/2}$  estivessem em torno de 25 h, para que o alimento seja considerado de boa qualidade do ponto de vista fermentativo.

O  $T_{1/2}$  mostrou que algumas plantas foram de difícil fermentabilidade, pois os valores foram acima de 25 h. A jurema preta foi a planta que teve os valores mais altos em duas regiões (62,8 e 42,2 h, em Pernambuco e na Bahia, respectivamente).

Para R1, foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as plantas nas três regiões estudadas. Os valores de R1 ficaram muito abaixo de 1, com isso, pode-se dizer que a maioria das plantas não seria de boa qualidade do ponto de vista fermentativo. A malva branca e a maniçoba, na Bahia, foram as plantas que apresentaram um valor de R1 mais próximo de 1.

A malva branca e a maniçoba apresentaram valores de FT, TT e TC mais baixos comparados a outras plantas, dentro de cada região, o que pode ser um fator que resultou em maior R1. Embora o sabiá possua alta concentração de compostos fenólicos o valor R2 foi elevado, o que pode estar relacionado a sua baixa fermentabilidade, que foi alcançada durante a incubação.

Para R2, foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre as plantas nas três regiões estudadas. R2 é um parâmetro usado para estimar se o ensaio de produção de gases foi longo o suficiente para exprimir o potencial fermentativo do alimento o que implica em saber se havia dados suficientes para o modelo de France et al. (1993) conseguir ajustar adequadamente os resultados. O ideal seria que esse

parâmetro fosse próximo a 1. Nas diferentes regiões, a malva branca, maniçoba e sabiá foram as que apresentaram R2 mais próximo de 1.

Tabela 3.3 – Bioensaio ( $\text{ml g}^{-1}$  MS) das plantas, incubadas com e sem polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação das plantas estudadas nos três estados do nordeste brasileiro

Regiões	Plantas	S/PEG	C/PEG	Incremento (%)
Pernambuco	angico	34,9 <sup>b</sup>	80,3 <sup>b</sup>	129,5 <sup>a</sup>
	aroeira	34,5 <sup>b</sup>	77,3 <sup>b</sup>	125,0 <sup>a</sup>
	jurema preta	17,9 <sup>c</sup>	26,5 <sup>c</sup>	48,3 <sup>b</sup>
	malva branca	91,4 <sup>a</sup>	97,4 <sup>a</sup>	6,1 <sup>c</sup>
	maniçoba	100,3 <sup>a</sup>	111,1 <sup>a</sup>	12,3 <sup>c</sup>
	EP	4,87	5,15	8,90
Bahia	catingueira	61,6 <sup>b</sup>	70,6 <sup>cd</sup>	14,8 <sup>b</sup>
	jurema preta	28,0 <sup>c</sup>	55,3 <sup>d</sup>	101,7 <sup>a</sup>
	leucena	58,6 <sup>b</sup>	80,4 <sup>bc</sup>	40,0 <sup>b</sup>
	malva branca	94,2 <sup>a</sup>	92,6 <sup>ab</sup>	-1,9 <sup>c</sup>
	maniçoba	92,0 <sup>a</sup>	107,5 <sup>a</sup>	17,3 <sup>b</sup>
	EP	5,62	6,13	10,23
Ceará	catingueira	66,6 <sup>a</sup>	73,6 <sup>a</sup>	10,4 <sup>b</sup>
	juazeiro	44,8 <sup>b</sup>	49,2 <sup>b</sup>	9,5 <sup>b</sup>
	jurema	31,2 <sup>c</sup>	69,0 <sup>a</sup>	122,1 <sup>a</sup>
	pau branco	18,1 <sup>d</sup>	18,7 <sup>b</sup>	8,8 <sup>b</sup>
	sabiá	19,9 <sup>d</sup>	45,5 <sup>b</sup>	131,1 <sup>a</sup>
	EP	2,68	2,73	12,4

<sup>a,b,c</sup> para cada região, médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem entre si (teste de Duncan,  $P < 0,05$ )

EP, erro padrão das médias

Os resultados do bioensaio são apresentados na Tabela 3.3. Em Pernambuco e na Bahia, malva branca e maniçoba resultaram em um baixo incremento na PG na presença de PEG. Também a catingueira, juazeiro e pau branco mostraram baixo incremento da PG. Como observado na Tabela 3.1 essas plantas apresentaram baixas concentrações de TC.

As plantas angico, aroeira, jurema preta e sabiá resultaram em incrementos maiores que 100%. Essas plantas contêm altos teores de FT, TT e TC, com exceção de angico e aroeira que tem valores considerados dentro do limite seguro de TC para ruminantes.

O PEG é um composto que se liga fortemente aos taninos, e pode cancelar seus efeitos adversos, disponibilizando os nutrientes, como proteína, para os microrganismos (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995b; MAKKAR, 2000).

Os resultados observados dos incrementos estão de acordo com os trabalhos de Getachew, Makkar e Becker (2000b), por Baba, Castro e Ørskov (2002) e por Vitti et al. (2005). Diferentes respostas observadas no presente experimento quanto aos incrementos e teores de taninos são possivelmente relacionados com a atividade biológica dos taninos.

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

### **3.4. CONCLUSÕES**

Nas três regiões estudadas as plantas apresentaram alto teor em PB e algumas espécies tiveram conteúdo de compostos fenólicos considerado prejudicial aos animais. Do presente estudo conclui-se que a maniçoba pode ser indicada como uma planta com potencial forrageiro.

#### 4 EFEITOS DE MÉTODOS DE SECAGEM NO VALOR NUTRICIONAL E NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TANINOS MEDIDA PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES

##### Resumo

Objetivou-se com o presente estudo (i) avaliar o nível e a variação sazonal de taninos em importantes plantas do semi-árido do nordeste do Brasil, (ii) investigar os efeitos de diferentes métodos de secagem (em estufa, ao sol ou à sombra) na composição química, e (iii) investigar a atividade biológica *in vitro* dos taninos, pela técnica de produção de gases e bioensaio com a presença do polietileno glicol (PEG). As espécies selecionadas foram angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) e maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*). Houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos conteúdos de PB, FDN, FDA, FT, TT e TC entre as épocas de chuva e seca. Os valores de FDN e FDA foram mais elevados na estação chuvosa, mas as concentrações de FT, TT e TC foram mais altas na seca. Os resultados dos métodos de secagem (estufa, sol e sombra) estudados não apresentaram diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos valores de PB, FDN e FDA e compostos fenólicos (FT, TT e TC). Também não houve diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na cinética de produção de gases (A, L) e nos parâmetros estudados ( $T_{1/2}$ , R1 e R2). O baixo incremento na produção de gases devido à presença do polietileno glicol (PEG), como medida da atividade biológica dos taninos, na malva branca e maniçoba foi devido à baixa concentração de taninos. O aumento na produção de gases devido à presença do PEG para angico, aroeira e jurema preta, mostraram uma maior atividade biológica dos taninos. Os métodos de secagem não foram eficientes para alterar os teores e a atividade biológica dos taninos.

Palavras-chave: caatinga, forrageiras, antinutricional, *in vitro*, polietileno glicol.

## EFFECTS OF DRYING METHOD ON THE NUTRIENT AVAILABILITY AND ON BIOLOGICAL ACTIVITY OF TANNINS USING GAS PRODUCTION TECHNIQUE

### Abstract

The purposes of this experiment were to examine the nutritive value of some browses collected from the Northeast of Brazil in dry and wet season. In addition, to study the effect of sun, oven (40°C) and shade drying methods on chemical composition, tannin bioassay and kinetics of gas production. The selected browses were angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) and maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*). There were significant differences among the investigated tropical plants in the CP, NDF, ADF, TP, TT and CT contents in wet and dry season. The NDF and ADF content were highest in wet season but the TP, TT and CT were highest in dry season. The results of drying methods showed that there were no significant differences in chemical NDF, ADF, CP and secondary compounds (TP, TT, CT). Also, there were no significant differences among these browses in kinetics of gas production (A, L, T1/2) and in R1 and R2. The low increment in gas production due to the presence of PEG as measurement of the tannin bioactivity in malva branca and manicoba is indicator of low tannin content. Jurema preta, angico and aroeira resulted in an increase in gas production due to the presence of PEG indicating high tannin bioactivity. Also, the results showed that there were no significant differences among different drying methods of browses when tannin bioactivity was measured. The drying methods were not efficient to produce changes on tannins concentration and activity.

Keywords: caatinga, forage, anti-nutritional, *in vitro*, polyethylene glycol.

## 4.1 INTRODUÇÃO

O ecossistema semi-árido é característico do nordeste brasileiro. O tipo de vegetação dessa região é chamado de caatinga e consiste em árvores e arbustos resistentes à seca e que possuem um valor relativamente alto de proteína bruta ( $200 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ ) (ARAÚJO FILHO; CARVALHO, 1998). Essas plantas são utilizadas por pequenos ruminantes como fontes de proteína e energia (ARAÚJO FILHO, 1990) e constituem o grupo forrageiro mais importante, compondo em até 90% da dieta dos ruminantes, principalmente durante os períodos críticos de seca (PETER, 1992). Apesar do elevado teor em proteína, a digestibilidade destas espécies arbóreas é considerada baixa, sendo que um dos fatores que contribuem para isto é o alto teor em taninos (LIMA, 1989). Alguns taninos podem produzir efeitos tóxicos e antinutricionais causando a redução no consumo voluntário, diminuição da digestibilidade aparente da matéria seca e da disponibilidade da proteína (LOWRY; McSWEENEY; PALMER 1996). Estes efeitos podem ocorrer dependendo do tipo e da concentração de taninos presentes na planta. É também demonstrado que a concentração de taninos depende da fertilidade do solo e condições ambientais (BARRY; FORSS, 1983). Segundo Araújo Filho e Carvalho (1997), poucas pesquisas têm sido feitas para avaliar e conservar os recursos de alimentos locais para estação seca, embora sabendo que caprinos pastam extensivamente durante a estação chuvosa. Algumas plantas taniníferas podem ser utilizadas efetivamente como alimento para ruminantes utilizando processos de detanificação simples e economicamente viáveis baseados em tratamentos com álcali e secagem (DOLLAHITE; HOUSHOLDER; CAMP, 1966; MURDIATI et al., 1990; MAKKAR;

SINGH, 1991; MUKURU et al., 1992).

Os objetivos do presente estudo foram: (i) avaliar o nível e a variação sazonal de taninos em importantes plantas do semi-árido do nordeste do Brasil, (ii) investigar os efeitos de diferentes métodos de secagem (em estufa, ao sol ou à sombra) nos teores de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), proteína bruta (PB), concentração de fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e taninos (TC), e (iii) investigar a atividade biológica *in vitro* dos taninos, pela técnica de produção de gases e bioensaio com a presença do polietileno glicol (PEG).

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Local e coleta de amostras**

As coletas foram realizadas na região semi-árida (Agreste) do estado de Pernambuco (latitude 8°4' S e longitude 34°53' O), no Centro de Treinamento e Profissionalização em Caprino-Ovinocultura de Sertânia, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), no município de Sertânia.

Esse estudo foi feito no ano de 2002 e as espécies coletadas foram: angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) e maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*). Essas plantas foram selecionadas porque estudos mostraram que elas são fontes alimentares importantes para caprinos e ovinos na caatinga

(ARAÚJO FILHO, 1990; BARROS; SOUZA; ARRUDA, 1997; ARAÚJO FILHO; CARVALHO, 1998).

As amostragens foram realizadas no período das chuvas (maio) e no período das secas (outubro), em área de 826 ha. Essa área foi dividida em três sub-áreas para a coleta das amostras. O material foi coletado de cinco plantas, de cada espécie, nas três sub-áreas, num total de aproximadamente 3 kg de matéria verde, para cada uma. A amostragem foi feita simulando o pastejo dos animais, sendo coletadas as folhas e ramos com no máximo até 6 mm de espessura. As árvores apresentavam uma altura aproximadamente de 2 m e, no tempo das coletas, em maio, as plantas estavam no estágio fenológico de vegetação plena a início de floração e, em outubro, no estágio fenológico inicial de dormência (queda das folhas).

O material coletado foi conservado em caixas de isopor contendo gelo e transportado o mais rápido possível para o laboratório na Estação Experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA).

O material coletado para cada espécie foi dividido em três partes para os tratamentos (secagem em estufa, ao sol ou à sombra) sendo então picados (< 3 cm). As amostras controle foram secas em estufa a 40°C, com circulação de ar forçada por 48 h. Para a secagem ao sol, as plantas picadas foram colocadas em bandejas de papelão e expostas ao sol por 72 h. As amostras secas à sombra também foram colocadas em bandejas de papelão e secas à sombra por 72 h. Todo o processo de secagem foi realizado no próprio local de trabalho, sendo que por várias vezes as plantas foram revolvidas para uma secagem homogênea.

Depois de realizada essa primeira etapa as amostras foram colocadas em sacos de papel, identificadas e transportadas para o Laboratório de Nutrição Animal

(LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) em Piracicaba, SP, onde foram feitas as análises.

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

#### **4.2.2 Análises químicas**

As plantas foram caracterizadas quimicamente segundo A.O.A.C. (1995) (MS – matéria seca; MM – matéria mineral; MO – matéria orgânica; e PB – proteína bruta). Os teores em fibra em detergente neutro (FDN) e fibra 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).

#### **4.2.3 Técnica de produção de gases e bioensaio**

A técnica *in vitro* de produção de gases foi utilizada para caracterização das plantas com o tempo de incubação de 96 h e o bioensaio (por apenas 24 h) para

avaliar os efeitos dos taninos presentes nas amostras após os tratamentos.

Foi feito o ensaio com as plantas coletadas no período da chuva, e submetidas, aos diferentes métodos de secagem.

A técnica de produção de gases foi conduzida de acordo com Maurício et al. (1998) e modificada por 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 utilizado o polietileno glicol.

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

#### **4.2.4 Análises estatísticas**

Para este experimento, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco plantas e três repetições. As análises de variância foram feitas 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%.

Para o primeiro ensaio, no qual foram estudadas as composições químicas das plantas em duas diferentes épocas (chuva e seca) (n=30), as médias foram comparadas pelo teste de t de Student, usando o seguinte modelo estatístico:

$Y_{ij} = \mu + E_i + (E*P)_{ij} + \varepsilon_{ij}$ , onde  $Y_{ij}$  é a variável dependente;  $\mu$ , a média geral;  $E_i$ , efeito

da época ( $i = 1$  a  $2$ );  $(E*P)_{ij}$ , a interação entre a época e as plantas ( $j = 1$  a  $5$ ); e  $\varepsilon_{ij}$ , o resíduo. Para o segundo ensaio, no qual foram estudadas as composições químicas das plantas coletadas na estação das chuvas e submetidas a três métodos de secagem (estufa, sol e sombra) ( $n=45$ ), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, usando o seguinte modelo estatístico:  $Y_{ij} = \mu + T_i + (T*P)_{ij} + \varepsilon_{ij}$ , onde  $Y_{ij}$  é a variável dependente;  $\mu$ , a média geral;  $T_i$ , efeito do tratamento (método de secagem) ( $i = 1$  a  $3$ );  $(T*P)_{ij}$ , a interação entre os tratamentos e as plantas ( $j = 1$  a  $5$ ); e  $\varepsilon_{ij}$ , o resíduo. Ambos os modelos não contemplaram o efeito das plantas ( $P_j$ ), pois este não foi o objetivo deste ensaio.

### **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.3.1 *Análise nutricional das plantas***

Os resultados das análises químicas das plantas coletadas nas estações seca e chuvosa e que foram secas em estufa ( $40^{\circ}\text{C}$ ) são apresentados na Tabela 4.1. Na estação seca, maniçoba e angico já estavam no estágio de dormência (sem folhas) o que não permitiu a coleta dessas duas espécies. Das outras três espécies, quando possível, foi feita uma coleta mais seletiva, o que pode ter vindo a influenciar nos valores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) desta estação (seca) em relação à chuvosa.

O teor de FDN foi significativamente menor na seca comparado com os

valores da época chuvosa para a malva branca ( $P < 0,05$ ) e o teor de FDA apresentou diferença entre as épocas para a jurema preta ( $P < 0,05$ ). Teores maiores de FDN e FDA em amostras na estação chuvosa têm sido observados em árvores e arbustos (LARBI et al., 1998; SHAYO; UDÉN, 1999; VENTURA et al., 2004).

Tabela 4.1 – Médias das composições químicas em  $\text{g kg}^{-1}$  MS, das plantas secas em estufa ( $40^\circ\text{C}$ ) coletadas em duas épocas do ano (chuva e seca)

Plantas	Época	FDN	FDA	PB	FT*	TT*	TC**
angico	chuva	486,0	239,8	102,4	119,4	111,2	11,3
	seca	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	EP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	P	nd	nd	nd	nd	nd	nd
aroeira	chuva	440,7	327,2	108,3	171,9	157,2	29,4
	seca	429,6	327,7	120,8	210,0	188,9	83,3
	EP	28,35	26,15	9,37	12,96	12,44	4,67
	P	0,796	0,991	0,399	0,187	0,146	0,001
jurema preta	chuva	556,7	428,8	160,8	156,6	140,2	49,0
	seca	501,8	359,3	107,1	182,0	165,4	106,7
	EP	21,91	13,52	5,67	17,48	16,40	9,22
	P	0,151	0,022	0,003	0,362	0,339	0,012
malva branca	chuva	649,1	341,9	115,0	11,4	7,9	0,1
	seca	616,2	340,8	98,0	18,1	12,5	0,4
	EP	8,28	17,09	6,85	1,31	1,09	0,07
	P	0,048	0,968	0,154	0,023	0,041	0,065
maniçoba	chuva	401,5	306,3	135,4	41,8	33,6	18,2
	seca	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	EP	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	P	nd	nd	nd	nd	nd	nd

\* fenóis totais (FT) e taninos totais (TT), em g. equivalente-grama ácido tânico  $\text{kg}^{-1}$  MS ; \*\* tanino condensado, em equivalente-grama leucocianidina  $\text{kg}^{-1}$  MS;

teste T de Student ( $P < 0,05$ ); EP, erro padrão das médias; P, probabilidade e nd, não determinado

O conteúdo de PB variou de 103 a 161 g kg<sup>-1</sup> MS. A jurema preta apresentou valor de PB mais alto na estação chuvosa que na seca (161 e 107 g kg<sup>-1</sup> MS, respectivamente; P<0,05).

Ventura et al. (2004) verificaram teores médios relativamente altos para PB (160 g kg<sup>-1</sup> MS) para espécies da caatinga. No entanto, Barros, Sousa e Arruda (1997) observaram valores de 127 e 120 g kg<sup>-1</sup> MS de PB para jurema preta e maniçoba. Durante o estágio de frutificação, os valores de PB foram em média 159 g kg<sup>-1</sup> MS para espécies da região da caatinga (ARAÚJO FILHO; CARVALHO; SILVA, 2002). Algumas das plantas do nordeste do Brasil, que perdem as folhas na estação seca, tendem a ter valores mais altos de PB quando as folhas novas aparecem na estação chuvosa (ARAÚJO FILHO; CARVALHO; SILVA, 2002).

Com relação aos compostos fenólicos, a aroeira apresentou concentrações mais altas de fenóis totais (FT) (171,9 eq-g ácido tânico kg<sup>-1</sup> MS) e taninos totais (TT) (157,2 eq-g ácido tânico kg<sup>-1</sup> MS), seguindo-se a jurema preta e o angico (Tabela 4.1). As concentrações de FT e TT não apresentaram diferenças significativas entre as duas estações (P>0,05) para aroeira e jurema preta, sendo significativa (P<0,05) apenas para malva branca. Para a malva branca, tanto para os FT como para TT, os teores foram maiores na estação seca (18,1 e 12,5 eq-g ácido tânico kg<sup>-1</sup> MS respectivamente para FT e TT) que na chuvosa (11,4 e 7,9 eq-g ácido tânico kg<sup>-1</sup> MS respectivamente para FT e TT). As concentrações de taninos condensados (TC) apresentaram diferenças significativas entre as duas estações (P<0,05) para a aroeira e jurema preta, sendo não significativas (P>0,05) apenas para malva branca.

Os resultados observados para de TP, TT e TC estão de acordo com os obtidos por Araújo Filho e Carvalho (1998) e Araújo Filho, Carvalho e Silva (2002).

Esses autores observaram que os valores mais altos ocorrem na estação seca, quando a maioria das plantas está na fase de frutificação. De acordo com os autores, a jurema preta apresentou valores de taninos mais altos durante a fase de frutificação do que durante a fase de vegetação plena e floração.

Mesmo existindo vários trabalhos descrevendo a composição bromatológica das principais leguminosas do semi-árido nordestino, poucos estudos avaliaram os taninos. As concentrações de TT variaram de 16,9 a 26,6% no feno de jurema preta (VASCONCELOS, 1997); de 31% nas folhas de jurema preta (BEELEN, 2002). Por outro lado, a diversidade de metodologias e a falta de padrões confiáveis dificultam a comparação entre os valores já apresentados na literatura para as espécies estudadas.

As concentrações de TT apresentadas nas estações chuvosa e seca respectivamente, nas plantas, aroeira (157 e 189 eq-g ácido tânico  $\text{kg}^{-1}$  MS), jurema preta (140 e 165 eq-g ácido tânico  $\text{kg}^{-1}$  MS) e no angico (111 eq-g ácido tânico  $\text{kg}^{-1}$  MS) na estação chuvosa, são consideradas altas pela literatura.

Nas plantas estudadas, a concentração de TC variou de 0,4 a 107 eq-g leucocianidina  $\text{kg}^{-1}$  MS e é comparável com outras plantas (LOPÉZ et al., 2004). De acordo com literatura, valores de TC acima de 60 eq-g leucocianidina  $\text{kg}^{-1}$  MS são considerados elevados (LONGLAND et al., 1995; McNEILL et al., 1998; BALOGUN; JONES; HOLMES, 1998; ECHEVERRÍA; BELMAR; SANTOS-RICALDE, 2002; FONDEVILA; NOGUEIRA FILHO; BARRIOS-URDANTES, 2002). Porém, variações no método analítico podem conduzir a grandes variações nos resultados obtidos (STEWART; MOULD; MUELLER-HARVEY, 2000; SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; MAKKAR, 2003b). Apesar dos níveis relativamente altos de taninos em algumas das plantas da caatinga, elas fazem parte da dieta de caprinos e ovinos,

principalmente durante períodos secos, quando outras vegetações estão dormentes (BARROS; SOUSA; ARRUDA, 1997). Durante a estação seca, folhas de arbustos perenes são importante fonte de proteína para os animais. Os animais na região de caatinga são, principalmente, os caprinos da raça Moxotó adaptados, através de seleção natural, para as condições severas (BARROS; SOUSA; ARRUDA, 1997). Esses caprinos adaptados estão mais capacitados a utilizar plantas contendo taninos que os outros animais não adaptados que vivem na região (SPRINKLE; GRUMBLES; MEEN, 2002).

#### **4.3.2 Efeitos dos tratamentos na composição química das plantas**

Os resultados das análises químicas das amostras coletadas nas estações chuvosa e seca e tratadas por meio de vários métodos de secagem estão apresentados na Tabela 4.2.

Os teores de FDN e FDA não variaram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) para aroeira e maniçoba. Para angico, jurema preta e malva branca os teores de FDN e FDA foram maiores para a secagem ao sol comparada com a secagem em estufa ( $P < 0,05$ ).

Os teores de PB não variaram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) para malva branca e maniçoba. No entanto, houve aumento no teor de PB no tratamento seco ao sol ( $P < 0,05$ ) para angico e aroeira, sendo que, para a jurema preta, ocorreu uma diminuição no teor de PB no tratamento seco ao sol em comparação aos secos em estufa e à sombra ( $P < 0,05$ ).

Tabela 4.2 – Médias das composições químicas em g kg<sup>-1</sup> MS, das plantas secas em estufa (40°C), ao sol e à sombra, coletadas na estação chuvosa

Plantas	Secagem	FDN	FDA	PB	FT*	TT*	TC**
angico	estufa	486,0 <sup>b</sup>	239,8 <sup>b</sup>	102,4 <sup>b</sup>	119,4 <sup>a</sup>	111,2 <sup>a</sup>	11,3 <sup>a</sup>
	sol	524,5 <sup>a</sup>	298,6 <sup>a</sup>	153,9 <sup>a</sup>	93,6 <sup>a</sup>	88,0 <sup>a</sup>	13,7 <sup>a</sup>
	sombra	516,4 <sup>ab</sup>	321,4 <sup>a</sup>	104,2 <sup>b</sup>	137,5 <sup>a</sup>	127,7 <sup>a</sup>	12,4 <sup>a</sup>
	EP	7,95	7,56	9,96	12,20	11,96	0,76
aroeira	estufa	440,7 <sup>a</sup>	327,2 <sup>a</sup>	108,3 <sup>b</sup>	171,9 <sup>a</sup>	157,2 <sup>a</sup>	29,4 <sup>a</sup>
	sol	476,6 <sup>a</sup>	357,8 <sup>a</sup>	151,6 <sup>a</sup>	189,5 <sup>a</sup>	176,5 <sup>a</sup>	34,3 <sup>a</sup>
	sombra	467,6 <sup>a</sup>	362,6 <sup>a</sup>	118,4 <sup>b</sup>	197,4 <sup>a</sup>	178,1 <sup>a</sup>	37,5 <sup>a</sup>
	EP	11,81	18,28	5,24	13,67	13,42	6,27
jurema preta	estufa	556,7 <sup>b</sup>	428,8 <sup>b</sup>	160,8 <sup>a</sup>	156,6 <sup>a</sup>	140,2 <sup>a</sup>	49,0 <sup>a</sup>
	sol	736,1 <sup>a</sup>	520,5 <sup>a</sup>	110,5 <sup>b</sup>	145,6 <sup>a</sup>	127,5 <sup>a</sup>	58,2 <sup>a</sup>
	sombra	590,0 <sup>b</sup>	450,9 <sup>ab</sup>	166,6 <sup>a</sup>	169,5 <sup>a</sup>	147,8 <sup>a</sup>	61,5 <sup>a</sup>
	EP	28,23	19,49	4,13	9,46	10,17	3,50
malva branca	estufa	649,1 <sup>b</sup>	341,9 <sup>b</sup>	115,0 <sup>a</sup>	11,4 <sup>a</sup>	7,9 <sup>a</sup>	0,1 <sup>b</sup>
	sol	742,9 <sup>a</sup>	383,4 <sup>a</sup>	109,9 <sup>a</sup>	9,5 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	0,4 <sup>a</sup>
	sombra	741,9 <sup>a</sup>	385,3 <sup>a</sup>	126,9 <sup>a</sup>	8,6 <sup>a</sup>	5,4 <sup>a</sup>	0,2 <sup>ab</sup>
	EP	5,53	9,40	5,96	1,09	0,90	0,05
maniçoba	estufa	401,5 <sup>a</sup>	306,3 <sup>a</sup>	135,4 <sup>a</sup>	41,8 <sup>a</sup>	33,6 <sup>a</sup>	18,2 <sup>a</sup>
	sol	442,8 <sup>a</sup>	333,0 <sup>a</sup>	125,5 <sup>a</sup>	36,2 <sup>ab</sup>	29,9 <sup>ab</sup>	13,5 <sup>ab</sup>
	sombra	582,8 <sup>a</sup>	424,8 <sup>a</sup>	157,7 <sup>a</sup>	27,4 <sup>b</sup>	22,8 <sup>b</sup>	8,9 <sup>b</sup>
	EP	58,44	40,24	13,19	2,09	1,94	2,07

\* fenóis totais (FT) e taninos totais (TT), em equivalente-grama ácido tânico kg<sup>-1</sup> MS; \*\* tanino condensado, equivalente-grama leucocianidina kg<sup>-1</sup> MS

<sup>a,b</sup> para a mesma planta, médias seguidas por letras diferentes, nas colunas, diferem entre si (teste de Tukey; P<0,05)

EP, erro padrão das médias

Os tratamentos não apresentaram diferenças significativas (P>0,05) para FT, TT e TC para angico, aroeira e jurema preta, sendo que na malva branca também não houve diferenças para FT e TT, já para TC houve aumento significativo

( $P < 0,05$ ) no tratamento seco ao sol em relação ao em estufa.

Maniçoba apresentou uma diminuição nos valores de FT, TT e TC no tratamento seco à sombra comparado com as amostras secas em estufa ( $P < 0,05$ ), sendo que, entre as secagens ao sol e em estufa ou entre à sombra e ao sol não foram verificadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) para FT, TT e TC.

Os resultados mostraram que os tratamentos secos ao sol e à sombra apresentaram mudanças significativas nos teores de FDN, FDA e PB comparados ao tratamento seco em estufa (Tabela 4.2). Porém, para FT, TT e TC não foram observadas mudanças nas concentrações ( $P > 0,05$ ) entre os três tratamentos na maioria das plantas. Esse resultado foi diferente do encontrado por Makkar e Singh (1991), que observaram diminuição na concentração de taninos em *Leucaena leucocephala* após secagem ao sol. De acordo com esses autores, a umidade desempenha um papel importante na inativação de taninos durante o processo de secagem. Esses mesmos autores observaram que folhas maduras de carvalho (40% de umidade) secas ao sol e à sombra não apresentaram diferenças nos níveis de FT e TC. Por outro lado, secando ao sol folhas de mandioca e leucena (65% de umidade) houve diminuição do teor de taninos. A diminuição dos valores analisados de taninos após secagem pode ser devido à complexação entre tanino e proteína, polimerização e oxidação dos taninos (BEN SALEM et al., 1997; MAKKAR, 2003b).

#### **4.3.3 Produção de gases e bioensaio**

Os resultados da produção de gases (PG) estão apresentados na Tabela

4.3. A produção potencial de gases (A) não apresentou diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para todas as plantas.

Tabela 4.3 – Produção potencial de gases (A,  $\text{ml g}^{-1}$  MS), tempo de colonização (L, h), tempo gasto para atingir metade do valor de A ( $T_{1/2}$ , h), R1 e R2 das plantas secas em estufa ( $40^\circ\text{C}$ ), secas ao sol e secas à sombra, coletadas na estação chuvosa

Plantas	Secagem	Parâmetros				
		A	L	$T_{1/2}$	R1	R2
angico	estufa	102,2 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	39,9 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>
	sol	92,3 <sup>a</sup>	2,2 <sup>a</sup>	39,0 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>	0,88 <sup>a</sup>
	sombra	107,7 <sup>a</sup>	1,9 <sup>a</sup>	44,1 <sup>a</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,83 <sup>a</sup>
	EP	8,40	0,65	3,31	0,03	0,02
aroeira	estufa	108,8 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>	54,1 <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,75 <sup>a</sup>
	sol	114,7 <sup>a</sup>	1,2 <sup>a</sup>	51,4 <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,76 <sup>a</sup>
	sombra	100,7 <sup>a</sup>	0,9 <sup>a</sup>	48,6 <sup>a</sup>	0,65 <sup>a</sup>	0,77 <sup>a</sup>
	EP	11,70	0,65	5,29	0,02	0,04
jurema preta	estufa	67,3 <sup>a</sup>	4,2 <sup>a</sup>	62,8 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,70 <sup>a</sup>
	sol	61,0 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	68,8 <sup>a</sup>	0,55 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>
	sombra	63,2 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	67,3 <sup>a</sup>	0,51 <sup>a</sup>	0,68 <sup>a</sup>
	EP	11,71	1,37	13,01	0,07	0,09
malva branca	estufa	139,7 <sup>a</sup>	3,5 <sup>a</sup>	24,1 <sup>a</sup>	0,86 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>
	sol	133,9 <sup>a</sup>	2,3 <sup>b</sup>	23,1 <sup>a</sup>	0,86 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>
	sombra	123,9 <sup>a</sup>	1,8 <sup>b</sup>	22,8 <sup>a</sup>	0,85 <sup>a</sup>	0,98 <sup>a</sup>
	EP	5,29	0,26	1,03	0,01	0,00
maniçoba	estufa	179,2 <sup>a</sup>	1,3 <sup>b</sup>	27,1 <sup>b</sup>	0,79 <sup>a</sup>	0,96 <sup>a</sup>
	sol	171,4 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup>	29,6 <sup>ab</sup>	0,77 <sup>ab</sup>	0,95 <sup>a</sup>
	sombra	156,2 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	34,9 <sup>a</sup>	0,71 <sup>b</sup>	0,93 <sup>a</sup>
	EP	6,64	0,33	1,65	0,02	0,01

<sup>a,b</sup> médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem entre si ( $P<0,05$ ; teste de Tukey)  
EP, erro padrão das médias

O tempo de colonização (L) não apresentou diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para angico, aroeira e jurema preta. Malva branca apresentou um menor

tempo de colonização ( $P < 0,05$ ) nas amostras seca ao sol e à sombra comparado à amostra seca em estufa. Maniçoba não apresentou diferença ( $P > 0,05$ ) entre a amostra seca ao sol e em estufa, no entanto, apresentou um aumento no tempo de colonização ( $P < 0,05$ ) no tratamento seco à sombra comparado ao em estufa.

R1 é um parâmetro para auxiliar a compreender e comparar as plantas. R1 representa, proporcionalmente, quanto da produção total de gases determinada em 96 h foi realizada nas primeiras 48 h de incubação. Seria desejável que a maior parte da fermentação ocorresse dentro desse período, ou seja, R1 deve ser o mais próximo de 1, para que o alimento seja considerado de boa qualidade do ponto de vista fermentativo. Angico, aroeira, jurema preta e malva branca não apresentaram diferença entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ).

Maniçoba teve uma diminuição no valor de R1 para o tratamento seco à sombra (0,71) comparado ao tratamento seco em estufa (0,79) ( $P < 0,05$ ), que também foi refletido no  $T_{1/2}$  que foi maior.

Em relação ao R1, angico, aroeira, jurema preta e maniçoba não apresentaram uma boa qualidade do ponto de vista fermentativo (0,68; 0,61; 0,55 e 0,79 respectivamente para as amostras secas em estufa), pois os valores foram considerados baixos.

Malva branca foi a planta que apresentou o maior valor de R1 (0,86) e também um menor tempo para atingir metade do potencial ( $T_{1/2} = 23,5$  h), sendo a planta que apresentou a melhor qualidade, do ponto de vista fermentativo.

O parâmetro R2 estima se o ensaio de produção de gases foi longo o suficiente para exprimir o potencial fermentativo do alimento e/ou se o modelo de France conseguiu ajustar os dados, portanto quanto mais próximo de 1, indica que o potencial de produção de gases foi atingido durante o ensaio. Como a produção

potencial de gases (A) é um valor assintótico estimado, nem sempre é atingido durante este período. Todas as plantas não apresentaram diferenças ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para R2. Malva branca e maniçoba foram as plantas que apresentaram os maiores valores de R2 (0,99 e 0,96 respectivamente), ou seja, 99% do seu potencial fermentativo pode ser expresso durante o ensaio, e não apresentaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos.

Os dados da produção de gases das amostras incubadas sem e com PEG por 24 h e a porcentagem de incremento de gases estão apresentados na Tabela 4.4.

As amostras não apresentaram diferenças ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos com e sem PEG no volume de gases produzidos por 24 h, apenas para maniçoba houve diferença ( $P<0,05$ ) entre os tratamentos secos à sombra e em estufa com a adição de PEG, sendo que, houve diminuição no volume de gases para o tratamento seco à sombra em relação ao em estufa (87 e 111 ml g<sup>-1</sup> MS, respectivamente).

A porcentagem de incremento na produção de gases após 24 h de incubação das plantas devido à adição de PEG teve variação ( $P<0,05$ ) apenas para jurema preta que mostrou um aumento na amostra seca ao sol de 113% e de 48% para amostra seca em estufa. Para as outras plantas não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos.

Esse resultado para jurema preta mostra que, mesmo não havendo alteração nos valores de FT, TT e TC nos tratamentos (Tabela 4.2), o tipo de secagem pode ter alterado a atividade dos taninos, pois a porcentagem de incremento com a adição de PEG na amostra seca ao sol foi bem maior que na seca em estufa.

Tabela 4.4 – Bioensaio ( $\text{ml g}^{-1}$  MS) das plantas secas em estufa ( $40^\circ\text{C}$ ), secas ao sol e secas à sombra, coletadas na estação chuvosa e incubadas com e sem polietileno glicol (PEG) por 24 h

Plantas	Secagem	S/PEG	C/PEG	Incremento (%)
angico	estufa	34,9 <sup>a</sup>	80,3 <sup>a</sup>	129,5 <sup>a</sup>
	sol	31,6 <sup>a</sup>	73,4 <sup>a</sup>	134,6 <sup>a</sup>
	sombra	32,4 <sup>a</sup>	74,9 <sup>a</sup>	131,2 <sup>a</sup>
	EP	2,23	4,51	7,62
aroeira	estufa	34,5 <sup>a</sup>	77,3 <sup>a</sup>	125,0 <sup>a</sup>
	sol	39,9 <sup>a</sup>	76,8 <sup>a</sup>	95,0 <sup>a</sup>
	sombra	32,5 <sup>a</sup>	73,1 <sup>a</sup>	130,9 <sup>a</sup>
	EP	3,96	3,97	16,67
jurema preta	estufa	17,9 <sup>a</sup>	26,5 <sup>a</sup>	48,3 <sup>b</sup>
	sol	12,9 <sup>a</sup>	27,3 <sup>a</sup>	112,7 <sup>a</sup>
	sombra	14,0 <sup>a</sup>	25,3 <sup>a</sup>	81,1 <sup>ab</sup>
	EP	1,17	2,28	10,81
malva branca	estufa	91,4 <sup>a</sup>	97,4 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>
	sol	96,4 <sup>a</sup>	97,4 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
	sombra	88,7 <sup>a</sup>	88,2 <sup>a</sup>	-0,9 <sup>a</sup>
	EP	6,04	8,08	4,05
maniçoba	estufa	100,3 <sup>a</sup>	111,1 <sup>a</sup>	12,3 <sup>a</sup>
	sol	75,4 <sup>a</sup>	103,4 <sup>ab</sup>	47,8 <sup>a</sup>
	sombra	61,2 <sup>a</sup>	87,2 <sup>b</sup>	46,5 <sup>a</sup>
	EP	10,59	3,96	19,65

<sup>a,b</sup> médias seguidas por letras diferentes, na coluna, diferem entre si ( $P < 0,05$ ; teste de Tukey)  
EP, erro padrão das médias

#### 4.4 CONCLUSÕES

A variação sazonal afetou o valor nutritivo das plantas estudadas bem como a concentração de taninos. O nível de tanino foi mais alto na estação seca que

na estação chuvosa.

Como não houve diferenças entre os métodos de secagem para as concentrações de taninos, recomenda-se à secagem das plantas ao sol como método de conservação de alimento para a época da seca, pela sua praticidade e baixo custo.

## 5 EFEITO DOS TRATAMENTOS COM CINZAS, HIDRÓXIDO DE CÁLCIO E POLIETILENO GLICOL NO VALOR NUTRICIONAL E NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS TANINOS PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GASES

### Resumo

Os objetivos deste estudo foram: (i) investigar os efeitos de diferentes tratamentos (polietileno glicol, hidróxido de cálcio e cinzas de madeira) na composição química de plantas com potencial forrageiro do nordeste brasileiro, e (ii) avaliar a atividade *in vitro* dos taninos, pela técnica de produção de gases (bioensaio) com a presença do polietileno glicol (PEG). As espécies selecionadas foram angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronian urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) e maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*). As plantas foram tratadas com solução de PEG (2g PEG: 1g TC), cinzas de madeira (10%) e hidróxido de cálcio (10%). Houve grande variação entre as plantas nos valores de proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e taninos condensados (TC). Os tratamentos com PEG, cinzas e hidróxido de cálcio diminuíram os teores de PB ( $P < 0,05$ ) para angico, aroeira e malva branca, mas resultaram em aumentos nos teores de PB para jurema preta e maniçoba. Os teores de FDN apresentaram uma redução na jurema preta tratada com PEG e cinzas e na malva branca com o tratamento cinzas, mas houve aumento significativo de FDN ( $P < 0,05$ ) para maniçoba em todos os tratamentos. Os tratamentos diminuíram ( $P < 0,05$ ) as concentrações de taninos condensados para todas as espécies estudadas. A técnica de produção de gases *in vitro*, utilizando o PEG foi usada para avaliar a atividade dos taninos nas plantas e fornecer informações da atividade biológica dos taninos. O aumento proporcional mais elevado na produção de gases com a adição de PEG indica uma atividade mais elevada dos taninos. Os aumentos da produção de gases na presença do PEG foram 3,9; 19,5; 91,4; 121,0 e 138,6% para malva branca, maniçoba, jurema preta, aroeira, e angico, respectivamente. As plantas tratadas com PEG mostraram uma diminuição ( $P < 0,05$ ) na atividade biológica dos taninos, indicando que este tratamento foi o mais efetivo para detanificação comparado com os tratamentos cinzas e hidróxido de cálcio. Os tratamentos com cinzas e hidróxido de cálcio foram eficientes apenas para a jurema preta e isto pode ser atribuído à alta concentração em taninos condensados comparada com as outras plantas.

Palavras-chave: caatinga, forrageiras, antinutricional, *in vitro*, taninos condensados.

## EFFECTS OF WOOD ASH, CALCIUM HYDROXIDE AND POLYETHYLENE GLYCOL TREATMENTS ON THE NUTRIENT AVAILABILITY AND ON THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF TANNINS USING GAS PRODUCTION TECHNIQUE

### Abstract

The objectives of this study were to investigate different treatments on the chemical composition and tannin bioassay for some tanniniferous plants from the Northeast of Brazil through the wet season. The selected browses were angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronian urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) and maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*). These browses were treated with polyethylene glycol (PEG), wood ash and calcium hydroxide (10%). There was a wide variation among the browses in crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), total phenol (TP), total tannins (TT) and condensed tannins (CT). The PEG, wood ash and calcium hydroxide treatments were decreased the CP ( $P < 0.05$ ) in angico, aroeira and malva branca but increased the CP content in jurema preta and maniçoba. The NDF content was declined ( $P < 0.05$ ) in jurema preta with PEG or wood ash treatments and malva branca but increased ( $P < 0.05$ ) in manicoba with all treatments. The treatments were significantly decreased the condensed tannins in all of the investigated browses. The *in vitro* gas method, together with use of a tannin-inactivating agent such as PEG has been used to evaluate tannin activity in browses and provides useful information on the biological activity of tannins in the rumen and the whole gastrointestinal tract. The highest proportional increase in gas production with addition of PEG, indicates the highest tannin activity. The increases on gas production in the presence of a tannin-inactivating agent, PEG, were 3.9, 19.5, 91.4, 121.0 and 138.6 % for malva branca, manicoba, jurema preta, aroeira, and angico, respectively. The treated browses with PEG showed the lowest ( $P < 0.05$ ) tannin bioactivity indicating that this treatment was the most effective approach in deactivation of the tannins in comparison to wood ash or calcium hydroxide treatments. The wood ash and calcium hydroxide treatments were effective only in the case of jurema preta, and this may be attributed to high CT content in jurema preta comparing to other browses.

Keywords: caatinga, forage, anti-nutritional, *in vitro*, condensed tannins.

## 5.1 INTRODUÇÃO

A principal limitação para produção animal, especialmente de ruminantes, em muitas regiões tropicais é a nutrição pobre que é caracterizada pela deficiência em proteína e alto conteúdo de fibras, presentes em pastagens nativas e restos de culturas, que geralmente constituem a dieta desses animais. Muitas leguminosas forrageiras têm altos teores de proteína e são potencialmente promissoras para superar deficiências de nutrientes, mas normalmente elas também apresentaram alguns fatores antinutricionais como taninos e outros compostos secundários (WINA; TANGENDJAJA; SUSANA, 2005).

Taninos são compostos polifenólicos que ocorrem nas plantas que possuem a habilidade de formar complexos com proteínas, carboidratos e outros nutrientes (LOWRY; McSWEENEY; PALMER, 1996). A formação de complexos, especialmente com proteínas, leva à menor absorção de nutrientes, agravando ainda mais o quadro de deficiência nas regiões tropicais.

Além disso, alguns taninos são tóxicos, causando problemas, mais graves aos animais, como lesões no trato gastrointestinal (ZHU et al., 1995).

Os complexos formados com taninos e proteínas e/ou carboidratos podem ser quebrados sob condições de alta acidez ( $\text{pH} < 3,5$ ) ou alcalinidade ( $\text{pH} > 7,5$ ) (BEN SALEM; SAGHROUNI; NEFZAOU, 2005). Estudos mostraram que tratamento de plantas taniníferas com fontes alcalinas (uréia, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, etc.) e agentes oxidantes (dicromato de potássio, permanganato de potássio, etc.) diminuiu a concentração de fenóis, taninos totais e taninos condensados (RUSSEL; LOLLEY, 1989; MAKKAR; SINGH, 1993). Porém, a desvantagem principal destes tratamentos químicos foi a perda de nutrientes solúveis

(BEN SALEM; SAGHROUNI; NEFZAOU, 2005).

Foram feitos esforços para melhorar a utilização das plantas taniníferas pelos os ruminantes por meio de redução do teor de tanino por tratamentos químicos, físicos ou biológicos (MAKKAR, 2003a). A técnica mais amplamente estudada é a adição de polietileno glicol (PEG), que se liga aos taninos e pode reduzir seu efeito negativo (BARRY; McNABB, 1999; PRIOLO et al., 2000; VILLALBA et al., 2002; MAKKAR, 2003a). Embora esta técnica de incorporação de PEG seja bastante efetiva, sucesso de sua adoção por fazendeiros depende da relação de custo-benefício. Outros métodos como tratamentos térmicos, aquosos e alcalinos também foram investigados para reduzir taninos em sementes ou cereais para consumo humano (BETA; ROONEY; TAYLOR, 2000; MARTÍNEZ et al., 2001; MAKKAR; SINGH. 1991, 1992, 1993).

A quantificação dos taninos geralmente é feita por métodos químicos, mas, um grande número de fatores pode interferir nos resultados, como método de secagem, moagem, solventes utilizados na extração, tipos de padrões. O efeito dos taninos para a nutrição animal não pode ser avaliado pela simples análise química (MLAMBO; MAKKAR, 2005).

Estudos *in vitro* mostraram que alguns taninos são mais ativos que outros (AERTS et al., 1999; OSBORNE; McNEILL, 2001, SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001; ANDRABI et al., 2005). O uso da técnica de produção de gases (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995a; MAKKAR, 2005) associada às análises químicas e outras técnicas, como rádio-ensaio com albumina marcada com  $^{125}\text{I}$  (SILANIKOVE et al., 1996), tem auxiliado na determinação da atividade dos taninos.

Os objetivos do presente estudo foram (i) investigar os efeitos de diferentes tratamentos (polietileno glicol, hidróxido de cálcio e cinzas) nos teores de matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido

(FDA), proteína bruta (PB), concentração de fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e taninos condensados (TC), e (ii) avaliar a atividade *in vitro* dos taninos, pela técnica de produção de gases (bioensaio) com a presença do polietileno glicol (PEG).

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Local e coleta de amostras

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Piracicaba, SP.

As espécies utilizadas foram: angico (*Anadenanthera macrocarpa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), jurema preta (*Mimosa hostilis*), malva branca (*Sida cordifolia*) e maniçoba (*Manihot pseudoglaziovii*). Essas espécies foram coletadas no Centro de Treinamento e Profissionalização em Caprino-Ovinocultura de Sertânia, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), no município de Sertânia, localizado no sertão pernambucano, no período das chuvas (maio).

Foram colhidos, de cada espécie, aproximadamente 3 kg matéria verde, em três pontos distintos e a amostragem foi feita simulando o pastejo dos animais; coletando as folhas e ramos com até 6 mm de espessura.

As plantas foram colocadas em bandejas de papelão e secas ao sol, até peso constante. Após a secagem parte das amostras foi moída (antes de serem aplicados os tratamentos – controle) em moinho Wiley, usando peneiras de

perfuração de 1 mm para análises químicas e técnicas *in vitro* e 0,25 mm para determinação de compostos fenólicos. O material moído foi armazenado a temperatura ambiente, num local arejado e escuro, para evitar a degradação dos taninos.

### **5.2.2 Tratamentos**

Os tratamentos consistiram de aplicação de solução de polietileno glicol (PEG), solução de cinzas de madeira e solução de hidróxido de cálcio. Para cada planta foram feitas 3 repetições por tratamento.

#### **5.2.2.1 Tratamento com a aplicação de PEG**

Para este tratamento foi utilizado o PEG 4000 (VETEC) na proporção de 2 g PEG para 1 g de tanino condensado presente na planta. Essa proporção foi baseada no trabalho de Ben Salem et al. (1999) e foi feita a determinação prévia dos taninos condensados para cada planta estudada.

Em cada aplicação, foi utilizada 100 g de amostra de matéria seca. Preparou-se 30 ml da solução de PEG na proporção indicada, para cada amostra (30 ml de água destilada mais PEG). Essa solução foi borrifada sobre cada amostra tendo-se o cuidado de misturar bem, umedecendo todo o material.

Após 30 minutos, foi feita secagem das amostras em estufa a 40°C por 24 h, seguindo-se moagem a 1 mm para análises químicas e técnicas *in vitro* e 0,25 mm para determinação de compostos fenólicos.

#### 5.2.2.2 Tratamento com solução de cinzas de madeira

O tratamento com cinzas foi feito segundo Makkar e Singh (1992). As cinzas foram obtidas em uma olaria localizada a aproximadamente 8 km de Piracicaba. As cinzas foram retiradas dos fornos desta olaria, onde haviam sido incineradas madeiras de pinus e/ou eucalipto. Esse material foi peneirado para a retirada de impurezas e partículas maiores.

Preparou-se solução de cinzas 10% e esta solução foi agitada por 20 minutos à temperatura ambiente, aguardando-se em seguida a decantação do material. O sobrenadante foi filtrado utilizando pano de algodão para remover as impurezas e o pH desta solução foi então medido (pH=11,37).

Amostras de 100 g de cada planta testada foram misturadas com 1 litro desta solução, permanecendo embebidas por 6 horas. Após este período as amostras foram retiradas, por filtração com pano de algodão, lavadas em um balde com 1 litro de água e secas a 40°C por 24 h, seguindo-se moagem a 1 mm para análises químicas e técnicas *in vitro* e 0,25 mm para determinação de compostos fenólicos.

### 5.2.2.3 Tratamento com solução de hidróxido de cálcio

Os procedimentos dos tratamentos das amostras com hidróxido de cálcio (comercial) foram os mesmos já descritos anteriormente para o tratamento com cinzas. O valor do pH desta solução foi de 12,25.

### 5.2.3 **Análises químicas**

As plantas foram caracterizadas quimicamente segundo A.O.A.C. (1995) (MS – matéria seca; MM – matéria mineral; MO – matéria orgânica; e PB – proteína bruta). Os teores em fibra em detergente neutro (FDN) e fibra 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).

### 5.2.4 **Bioensaio**

A metodologia para o bioensaio é a mesma utilizada na produção de gases (MAURÍCIO et al., 1998) e foi utilizada para avaliar a atividade dos taninos após os tratamentos.

Para este ensaio, foram comparadas as plantas secas ao sol (usadas como controle) com as tratadas com as soluções de polietileno glicol (PEG), de cinzas de madeira 10% e de hidróxido de cálcio 10%.

Cerca de 1 g de cada amostra foi colocado em garrafas de vidro de 160 ml, previamente identificadas, em quadriplicatas, 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 foi adicionado 90 ml de solução nutritiva e 10 ml de inóculo. 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. Os seguintes horários foram usados para medida de pressão dos gases produzidos: 3, 6, 9, 12, 16, 24 h após inoculação, por meio de um transdutor - medidor de pressão (PDL800, LANA/CENA-USP, Piracicaba/SP) (THEODOROU et al., 1994),

### **5.2.5 Análise estatística**

Para este experimento, foi adotado o delineamento inteiramente casualizado, com cinco plantas e três repetições. As análises de variância foram feitas 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 15 amostras foram secas ao sol e submetidas a três tratamentos (PEG, cinzas e cal), sendo as amostras secas ao sol consideradas como controle.

As médias das variáveis (n=60) foram comparadas pelo teste de Dunnett, sendo os tratamentos comparados individualmente ao controle, usando o seguinte modelo estatístico:  $Y_{ij} = \mu + T_i + (T*P)_{ij} + \varepsilon_{ij}$ , onde  $Y_{ij}$  é a variável dependente;  $\mu$ , a média geral;  $T_i$ , efeito do tratamento (i = 1 a 4);  $(T*P)_{ij}$ , a interação entre os tratamentos e as plantas (j = 1 a 5); e  $\varepsilon_{ij}$ , o resíduo. O modelo não contemplou o efeito das plantas (Pj), pois este não foi o objetivo deste ensaio.

### **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.3.1 *Análises químicas***

Os resultados das análises químicas estão apresentados na Tabela 5.1. De um modo geral, o efeito dos tratamentos na composição química variou entre as plantas testadas. Todas as plantas apresentaram um alto teor de PB, mostrando que são fontes potenciais que podem ser utilizadas como recurso alimentar, especialmente nas regiões carentes de alimentos para os animais.

Houve decréscimo ( $P < 0,05$ ) do teor de PB para o angico e aroeira para os três tratamentos. Essa redução correspondeu a aproximadamente 30% em relação às plantas sem tratamento. Os teores de PB para malva branca e maniçoba não apresentaram efeitos dos tratamentos e jurema preta apresentou um aumento de PB nos tratamentos com cinzas e com cal. Ben Salem, Saghrouni e Nefzaoui (2005) observaram um aumento nos teores de PB em relação ao controle para plantas

tratadas com cinzas.

Tabela 5.1 – Médias das composições químicas em g kg<sup>-1</sup> MS, das plantas secas ao sol, tratadas com PEG, cinzas e cal, coletadas na época das chuvas

Plantas	Tratamento	MM	FDN	FDA	PB	FT <sup>1</sup>	TT <sup>1</sup>	TC <sup>2</sup>
angico	controle	56,1	524,5	298,6	153,9	93,6	88,0	13,7
	PEG	55,9	552,3	332,9	105,8*	123,4	112,7	11,3
	cinzas	59,8	569,9	312,4	103,8*	112,5	105,8	8,5*
	cal	60,8	563,1	364,1	115,7*	94,0	85,7	5,4*
	EP	1,64	19,48	47,05	8,57	18,18	16,93	0,99
aroeira	controle	48,0	476,6	357,8	151,6	189,5	176,5	34,3
	PEG	47,3	558,7	377,8	101,1*	181,8	158,2	8,0*
	cinzas	63,4	489,8	390,9	110,6*	137,0	117,7*	10,7*
	cal	57,1	558,8	388,6	111,8*	125,1*	112,5*	7,1*
	EP	4,48	23,63	44,82	4,56	13,32	12,89	3,97
jurema preta	controle	33,9	736,1	520,5	110,5	145,6	127,5	58,2
	PEG	31,8	544,7*	416,9*	140,4	127,0	107,6	7,5*
	cinzas	39,0	610,9*	474,4	171,9*	87,6*	71,0*	12,6*
	cal	36,6	679,4	547,3	152,2*	85,7*	69,9*	11,0*
	EP	2,01	20,38	16,32	9,63	13,16	11,59	1,73
malva branca	controle	58,7	742,9	383,4	109,9	9,5	6,2	0,4
	PEG	61,4	712,1	383,2	111,0	10,4	6,6	0,5
	cinzas	74,8	658,1*	378,2	91,9	5,7	3,5	0,1*
	cal	58,1	723,5	394,7	91,1	5,3	3,3	0,1*
	EP	4,43	10,28	14,55	6,64	1,52	1,11	0,07
maniçoba	controle	79,8	442,8	333,0	125,5	36,2	29,9	13,5
	PEG	86,0	604,9*	453,5*	134,5	31,1	25,2	5,2*
	cinzas	95,5*	583,8*	437,0*	149,9	15,6*	12,3*	1,6*
	cal	89,1*	639,5*	465,4*	144,2	11,0*	8,3*	1,1*
	EP	1,96	20,69	18,34	8,50	2,94	2,37	1,09

<sup>1</sup> fenóis totais (FT) e taninos totais (TT), em g kg<sup>-1</sup> MS equivalente-g AT; <sup>2</sup> tanino condensado (TC), g kg<sup>-1</sup> MS equivalente-g leucocianidina;

EP, erro padrão das médias

\* médias seguidas por asterisco, na coluna, diferem do controle (P<0,05; teste de Dunnett)

Mesmo com essas alterações no teor de PB, os valores são altos em relação a outras forragens, podendo essas plantas constituírem de fontes protéicas aos animais.

Também algumas alterações nos teores de FDN e FDA foram observadas para jurema preta, malva branca e maniçoba, mas, foram muito variadas, impossibilitando uma explicação conclusiva.

Houve decréscimo significativo ( $P < 0,05$ ) nos teores de TC para os tratamentos com cinzas e com cal para todas as plantas estudadas.

Para FT e TT, aroeira, jurema preta e maniçoba responderam significativamente ( $P < 0,05$ ) aos tratamentos com cinzas e com cal. Wina, Tangendjaja e Susana (2005) observaram decréscimo de mais de 70% nas concentrações de FT e TT para o tratamento com cal e de 52% para os teores de TC. Os dados da Tabela 5.1, mostram que a redução nos TC foi maior que 50%, concordando com os autores acima. A redução nos teores de FT, TT e TC obtidos no presente experimento é também relatada por outros autores (MAKKAR; SINGH, 1992). Esse decréscimo deve-se provavelmente à oxidação dos taninos pela alcalinidade (TAO et al., 1998) das soluções de cinzas de madeira e hidróxido de cálcio. Conforme relatado nos itens (5.2.2.2 e 5.2.2.3) do material e métodos, os valores de pH das soluções de cinzas de madeira e hidróxido de cálcio foram 11,37 e 12,25, respectivamente.

No presente experimento o PEG não alterou os teores de FT e TT, para todas as plantas estudadas. Para os teores de TC, angico e malva branca não responderam significativamente ( $P > 0,05$ ) ao tratamento com PEG.

Os benefícios do uso do PEG como agente neutralizante de taninos para melhorar os valores nutricionais de plantas taniníferas têm sido descritos

(SILANIKOVE; PEREVOLOTSKY; PROVENZA, 2001; MAKKAR, 2003a). Ben Salem, Saghrouni e Nefzaoui (2005) observaram uma diminuição nas concentrações de FT, TT e TC para acácia e carvalho com o tratamento PEG.

A ação do PEG dá-se pela ligação com os taninos condensados, liberando as proteínas, que ficam disponíveis para os microrganismos e enzimas da digestão.

Para Ben Salem et al. (1999), a quantidade de 2 mg PEG mg<sup>-1</sup> TC foram suficientes na extração de TC da acácia. No presente experimento, a mesma quantidade de PEG foi usada, mas, provavelmente não foi suficiente para cancelar a ação dos TC no angico e malva branca.

As diferentes respostas obtidas no presente trabalho com relação aos FT, TT e TC podem também estar relacionadas às conformações moleculares em que os fenóis encontram-se nas plantas e que podem afetar a atividade desses compostos.

### **5.3.2 Bioensaio**

A Tabela 5.2 mostra para os tratamentos, em relação ao controle, os incrementos (%) da produção de gases (PG) quando se adiciona o PEG ao meio de incubação. O PEG é usado como agente que se liga aos taninos inibindo seus efeitos biológicos.

Tabela 5.2 – Bioensaio ( $\text{ml g}^{-1}$  MS) dos tratamentos das plantas secas ao sol, coletadas na época das chuvas incubadas com e sem polietileno glicol (PEG) por 24 h

Plantas	Tratamentos	S/ PEG	C/PEG	Incremento (%)
angico	controle	30,2	71,4	138,6
	PEG	47,1	66,3	40,9*
	cinzas	26,3	58,9	124,9
	cal	28,0	55,6	100,4
	EP	1,53	1,31	11,46
aroeira	controle	34,8	74,3	121,0
	PEG	48,2	65,4	36,1*
	cinzas	27,6	59,5	115,5
	cal	27,8	61,0	120,1
	EP	2,45	1,82	15,58
jurema preta	controle	18,7	35,4	91,4
	PEG	25,2	26,3	5,5*
	cinzas	25,8	34,2	33,1*
	cal	20,5	27,5	36,1*
	EP	2,08	1,93	11,18
malva branca	controle	89,7	93,2	3,9
	PEG	82,0	85,8	4,8
	cinzas	64,2	67,2	5,4
	cal	62,2	61,1	-1,0
	EP	5,05	4,72	4,38
maniçoba	controle	80,4	95,9	19,5
	PEG	67,3	72,0	6,9*
	cinzas	59,7	64,0	7,1
	cal	48,9	59,4	21,2
	EP	2,98	4,31	3,05

\* médias seguidas por asterisco, na coluna, diferem do controle ( $P < 0,05$ ; teste de Dunnett); EP, erro padrão das médias

A adição de PEG ao meio de fermentação *in vitro* na presença de plantas ou alimentos contendo taninos, deve provavelmente levar a um aumento na PG (MAKKAR; BLÜMMEL; BECKER, 1995a; GETACHEW; MAKKAR; BECKER, 2000b). Esse aumento é expresso como porcentagem da relação entre a PG na ausência e na presença de PEG. Assim, quanto maior for o incremento maior será a atividade dos taninos presentes, e, portanto menos efetivo o tratamento.

Na Tabela 5.2, observa-se que, para o tratamento com PEG, o incremento foi menor ( $P < 0,05$ ) em relação ao controle indicando a eficiência deste tratamento em diminuir a atividade dos taninos, o que está de acordo com Ben Salem, Saghrouni e Nefzaoui (2005).

Com exceção da jurema preta, os tratamentos com cinzas e com cal não foram efetivos quando comparados ao controle, porque as demais plantas contêm baixos teores de TC. Observou-se que para jurema preta o aumento na PG em relação ao controle foi aproximadamente 37%.

A baixa efetividade dos tratamentos com cinzas e com cal foi verificada por Wina, Tangendjaja e Susana (2005).

Comparando-se os resultados da PG com os dados das análises químicas, principalmente para TC, há uma controvérsia pois, nas análises químicas todos os tratamentos reduziram os valores de TC mas, na produção de gases apenas o tratamento com PEG se mostrou eficiente. O que pode ter ocorrido é que os taninos complexados, não detectados nas análises químicas, podem ter afetado o processo de fermentação, uma vez que durante a mesma podem ter sido liberados (MAKKAR, 2003a).

Outra causa da redução da produção de gases pode ter sido a remoção de nutrientes fermentescíveis como carboidratos solúveis e outras fontes de energia

durante a aplicação dos tratamentos com cinzas e com cal (MARTÍNEZ et al., 2001; WINA, TANGENDAJA, SUSANA, 2005).

#### **5.4 CONCLUSÕES**

Os tratamentos foram eficazes para redução da concentração de taninos condensados avaliada pela análise química.

No entanto, apenas o tratamento com polietileno glicol apresentou efeito na diminuição na atividade dos taninos das plantas, com exceção da jurema preta .

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas nativas da caatinga constituem uma alternativa real para a pecuária do semi-árido nordestino, principalmente devido à adaptação dessas espécies às severas condições climáticas. Contudo, o valor nutricional aparece como limitante por várias razões e entre elas, a alta concentração em compostos fenólicos parece ser de fundamental importância, como ficou caracterizado ao longo desse trabalho.

A época do ano e a distribuição geográfica são fatores que alteram as concentrações de taninos.

Tratamentos químicos podem minimizar os efeitos dos fatores antinutricionais, como os taninos condensados, presentes nas plantas.

A secagem ao sol é um método efetivo e simples que pode ser aplicado no campo.

Estudos devem ser feitos utilizando-se outros tratamentos e avaliação com ensaios *in vivo* é recomendada.

## REFERÊNCIAS

AERTS, R.J.; BARRY, T.N.; McNABB, W.C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 75, p. 1-12, 1999.

AHN, J.H.; ROBERTSON, B.M.; ELLIOTT, R.; GUTTERIDGE, R.C.; FORD, C.W. Quality assessment of tropical browse legumes: Tannin content and protein degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 27, p. 147-156, 1989.

ANDRABI, S.M., RITCHIE, M.M., STIMSON, C., HORADAGODA, A., HYDE, M., MCNEILL, D.M. In vivo assessment of the ability of condensed tannins to interfere with the digestibility of plant protein in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 13-27, 2005.

ARAUJO FILHO, J.A. Manipulação da vegetação lenhosa da caatinga para fins pastoris. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DA ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 3., 1990, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: UFPB, 1990. p. 80-93.

ARAUJO FILHO, J.A., CARVALHO, F.C. **Fenologia e valor nutritivo de espécies lenhosas caducifolias da caatinga**. Sobral: EMBRAPA, CNPC, 1998. 5 p. (Comunicado Técnico, 39).

ARAUJO FILHO, J.A.; CARVALHO, F.C. **Desenvolvimento sustentado da caatinga**. Sobral: EMBRAPA, CNPC, 1997. 19 p. (Circular Técnica,13).

ARAUJO FILHO, J.A.; CARVALHO, F.C.; SILVA, N.L. Fenologia e valor nutritivo de follages de algunas especies forrageras de la caatinga. **Agroforesteria en las Americas**, Costa Rica, v. 9, p. 33-37, 2002.

ARAÚJO FILHO, J.A.; GADELHA, J.A.; SOUZA, P.Z. et al. Produção de fitomassa do extrato herbáceo da caatinga manipulada sob pastoreio combinado. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30, 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBZ, 1993. p. 135.

ARAÚJO, E.C.; VIEIRA, M.E. de Q. Nutritive value and voluntary intake of native forage of semi- arid region of Pernambuco I. Orelha de onça. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987, Brasília. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA, CNPC, 1987a. p. 1407.

ARAÚJO, E.C.; VIEIRA, M.E. de Q. Nutritive value and voluntary intake of native forage of semi- arid region of Pernambuco II. Camaratuba (*Cratylia mollis*). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 4., 1987, Brasília. **Proceedings...** Brasília: EMBRAPA, CNPC, 1987b. p. 1408.

ARAÚJO, E.C.; VIEIRA, M.E. de Q. Valor nutritivo e consumo voluntário de forrageiras nativas da região semi-árida de Pernambuco III. Mororó. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 7, p. 77-83, 1990.

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.

BALOGUN, R.O.; JONES, R.J.; HOLMES, J.H.G. Digestibility of some tropical browse species varying in tannin content. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 76, p. 77-88, 1998.

BARROS, N.N.; SOUSA, F.B.; ARRUDA, F.A. **Utilização de forrageiras e resíduos agroindustriais por caprinos e ovinos**. Sobral: EMBRAPA, CNPC, 1997. 28 p. (Documentos, 26).

BARRY, T.N.; FORSS, D.S. The condensed tannin content of vegetative *Lotus pedunculatus*, its regulation by fertiliser application, and effect upon protein solubility. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 34, p. 1047-1056, 1983.

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.

BARRY, T.N.; McNABB, W.C. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 81, p. 263-272, 1999.

BEELEN, P.M.G. **Tanino condensados de leguminosas nativas do semi-árido nordestino**. 2002. 71 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2002.

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.

BEN SALEM, H.; NEFZAOU, A.; BEN SALEM, L.; TISSERAND, J.L. Intake, digestibility, urinary excretion of purine derivatives and growth by sheep given fresh, air-dried or polyethylene glycol-treated foliage of *Acacia cyanophylla* Lindl. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 78, p. 297-311, 1999.

BEN SALEM, H.; NEFZAOU, A.; FERCHICHI, H.; BEN SALEM, L.; TISSERAND J. L. Intake and digestion in sheep given fresh or air-dried *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. **Annales de Zootechnie**, Paris, v. 46, p. 361-374, 1997.

BEN SALEM, H.; SAGHROUNI, L.; NEFZAOU, A. Attempts to deactivate tannins in fodder shrubs with physical and chemical treatments. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 109-121, 2005.

BETA, T.; ROONEY, L.W.; TAYLOR, J.R.N. Effect of chemical conditioning on the milling of high-tannin sorghum. **Journal of the Science and Technology**, Oxford, v. 80, p. 2216-2222, 2000.

BRANDES, D.; FEITAS, E.A.G. Taninos condensados – uma ferramenta para melhorar o desempenho de ruminante. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 5, n. 3, p. 44-48, 1992.

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.; 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.

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.

BUTLER, L.G. New perspectives on the antinutritional effects of tannins. In: KINSELLA, J.E.; SOUCIE, B. (Ed.). *Foods products*. Champaign: AOCS, 1989. chap. 22, p. 402-409.

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.

DESCHAMPS, A.M. Evaluation of the degradation of 2 types of tannin condensed by bacteria isolated from decaying bark. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, n. 5, p. 499-502, 1985.

DESCHAMPS, A.M.; LEBEAULT, J.M. Production of gallic acid from tara (*Caesalpinia spinosa*) tannin by bacterial strains. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 6, p. 237-242, 1985.

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

DEVENDRA, C. The use of shrubs and tree fodders by ruminants. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Shrubs and tree fodders for farm animals**. Ottawa: International Development Research Centre, 1990. p. 24-29.

DOLLAHITE, J.W.; HOUSHOLDER, G.T.; CAMP, B.J. Effect of calcium hydroxide on the toxicity of post oak (*Quercus stallata*) in calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 148, n. 8, p. 908-912, 1966.

ECHEVERRÍA, V.; BELMAR, R.; LY, J.; SANTOS-RICALDE, R.H. Effect of *Leucaena leucocephala* leaf meal treated with acetic acid or sodium hydroxide on apparent digestibility and nitrogen retention in pig diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 151-159, 2002.

FONDEVILA, M.; NOGUEIRA-FILHO, J.C.M.; BARRIOS-URDANETA, A. In vitro microbial fermentation and protein utilisation of tropical forage legumes grown during the dry season. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 95, p. 1-14, 2002.

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.; 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.

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**, Cambridge, v. 84, p. 73-83, 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.

GRIFFITHS, R.A. Feeding niche overlap and food selection in smooth and palmate newts, *T. vulgaris* and *T. helveticus* at a pond in mid-Wales. **Journal of Animal Ecology**, London, v. 55, p. 201-214, 1986.

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

HASLAM, E. **Plant polyphenols: vegetable tannins revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

HOVE, L.; TOPPS, J.H.; SIBANDA, S.; NDLOVU, L.R. Nutrient intake and utilization by goats fed dried leaves of the shrub legumes *Acacia angustissima*, *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala* as supplements to native pasture hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 95-106, 2001.

KUMAR, R.; D'MELLO, J.P.F. Antinutritional factors in forage legumes. In: D'MELLO, J.P.F., DEVENDRA, C. (Ed.). **Tropical legumes in animal nutrition**. Wallingford: CAB International, 1995. p. 95-133.

LARBI, A.; SMITH, J.W.; KURDI, I.O.; SDEKUNLE, I.O.; RAJI, A.M.; LADIPO, D.O. Chemical composition, rumen degradation and gas production characteristics of some multipurpose fodder trees and shrubs during wet and dry seasons in the humid tropics. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 72, p. 81-96, 1998.

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

LIMA, D.A. **Plantas da caatinga**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1989. 243 p.

LOHAN, O.P.; LALL, D.; VOID, J.; NEGI, S.S. Utilization of oak tree (*Quercus incana*) fodder in cattle rations and fate of oak-leaf tannins in the ruminant system. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 53, p. 1057-1063, 1983.

LONGLAND, A.C.; THEODOROU, M.K.; LISTER, S.J.; MORRIS, P.; GILL, M. The ability of polyethylene glycol to enhance the digestion of tropical forage legumes of varying tannin content. In: BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE MEETING, 45., 1995, Edinburgh. **Proceedings...** Penicuik: BSAS, 1995.

LOPÉZ, J.; TEJADA, I.; VÁSQUEZ, C.; de DIOS GARZ, J.; SHIMADA, A. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their *in vitro* biological activity. Part 1. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 291-294, 2004.

LOWRY, J.B.; MCSWEENEY, C.S.; PALMER, B. Changing perceptions of the effect of plant phenolics on nutrient supply in the ruminant. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 47, p. 829-842, 1996.

MAKKAR, H.P.S. Chemical, protein precipitation and bioassays for tannins, effects and fate of tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. In: SEMINAR OF THE FAO-CIHEAM SUB-NETWORK ON SHEEP AND GOAT NUTRITION, 9, 2001, Hammamet, Tunisia. Vienna: FAO/IAEA, 2001. 60 p.

MAKKAR, H.P.S. **Quantification of tannins in tree foliage.** Vienna: FAO; IAEA, 2000. (Laboratory Manual).

MAKKAR, H.P.S. **Quantification of tannins in tree and shrubs foliages - A laboratory manual.** Dordrecht: Kluwer-Plenum Press, 2003a.

MAKKAR, H.P.S. Effects and fate of tannins in ruminants animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 49, p. 241-256, 2003b.

MAKKAR, H.P.S. In vivo gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 291-302, 2005.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity? **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 40, p. 59–68, 1998.

MAKKAR, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in vitro techniques. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 73, p. 897-913, 1995a.

MAKKAR, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BECKER, K. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 69, p. 481-493, 1995b.

MAKKAR, H.P.S.; BLÜMMEL, M.; BOROWY, N.K.; BECKER, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 61, p. 161-165, 1993.

MAKKAR, H.P.S.; SINGH, B. Effect of wood ash on tannin content of oak (*Quercus incana*) leaves. **Bioresource Technology**, Essex, v. 41, p. 85-86, 1992.

MAKKAR, H.P.S.; SINGH, B. Distribution of condensed tannins (proanthocyanidins) in various fibre fractions in young and mature leaves of some oak species. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 253-260, 1993.

MAKKAR, H.P.S.; SINGH, B. Effect of drying conditions on tannin, fibre and lignin levels in mature oak (*Quercus incana*) leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 54, p. 323-328, 1991.

MANGAN, J.L. Nutritional effects of tannins in animal feeds. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 1, p. 209-231, 1988.

MARTÍNEZ, C.J.; SANCHEZ, H.H.; MANILLA, G.A.; QUINTOS, N.R.; HERRERA, J.M., ORTIZ, G.D. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus campestris* seeds. **Journal of the Science and Technology**, Oxford, v. 81, p. 421-428, 2001.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. Semi automation of the *in vitro* gas production technique using a pressure transducer. In: ANNUAL MEETING OF THE BRITISH SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, Scarborough, 1998. **Posters**. Penicuik: BSAS, 1998. p. 70.

McDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, C.A.; MORGAN, C.A. **Animal nutrition**. 5.ed. Zaragoza: Acribia, 1995. 576p.

MCNEILL, D.M.; OSBORNE, N.; KOMOLONG, M.K.; NAHKERVIS, D. Condensed tannins in the genus *Leucaena* and their nutritional significance for ruminants. In: SHELTON, H.M.; GUTTERIDGE, R.C.; MULLIN, B.F.; BRAY, R.A. (Ed.). **Leucaena - Adaptation, quality and farming systems**. Canberra: ACIAR, 1998. p. 205-214. (Proceedings, 86).

MCSWEENEY, C.S.; PALMER, B.; MCNEIL, D.M.; KRAUSE, D.O. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 83–93, 2001.

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

MLAMBO, V., MAKKAR, H.P.S. Calibration and validation of the <sup>14</sup>C-labelled polyethylene glycol-binding assay for tannins in tropical browse. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 29-40, 2005.

MUELLER-HARVERY, I. Analysis of hydrolysable tannins. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 3-20, 2001.

MUELLER-HARVEY, I.; MCALLAN, A.B.; THEODOROU, M.K.; BEEVER, D.E. Phenolics in fibrous crop residues and plants and their effects on digestion and utilization of carbohydrate and proteins in ruminants. In: REED, J.D.; CAPPER, B.S.; NEATE, P.J.H. (Ed.). **Plant breeding and the nutritive value of crop residues**. Addis, Ethiopia: ILCA, 1987. session 2.

MUKURU, S.Z.; BUTLER, L.G.; ROGLER, J.C.; KIRLEIS, A.W.; EJETA, G.; AXTELL, J.D.; MERTZ, E.T. Traditional processing of high-tannin Sorghum grain in Uganda and its effect on tannin, protein digestibility and rat growth. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 40, p. 1172-1175, 1992.

MURDIATI, T.B.; MCSWEENEY, C.S.; CAMPBELL, R.S.F.; STOLTZ, D.S. Prevention of hydrolysable tannin toxicity in goats fed *Clidemia hirta* by calcium hydroxide supplementation. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 10, p. 325-331, 1990.

MURDIATI, T.B.; MCSWEENEY, C.S.; COWRY, J.B. Hydrolysable tannins in forages: metabolism in sheep. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NUTRITION OF HERBIVORES, 2., 1987, Brisbane. **Proceedings...** Brisbane: University of Queensland, 1987. p. 45-46.

NACZK, M.; NICHOLS, T.; PINK, D.; SOSULSKI, F. Condensed tannins in canola hulls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 10, p. 2196-2200, 1994.

NOZELLA, E.F.; CABRAL FILHO, S.L.S.; BUENO, I.C.S.; GODOY, P.B.; LONGO, C.; BORGES, J.H.; VITTI, D.M.S.S. Caracterização de forrageiras do nordeste utilizando a técnica de produção de gases, composição química e quantificação de taninos. 1. Plantas do Estado da Bahia (1). In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: SBZ, 2006.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I.M. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 92, p. 499-503, 1979.

OSBORNE, N.J.T., MCNEILL, D.M. Characterisation of Leucaena condensed tannins by size and protein precipitation capacity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1113-1119, 2001.

OTCHERE, E.O.; NURU, S. Ruminant livestock production and feed resources in the sub-humid zone of Nigeria: constraints and perspectives. **Journal of Animal Research**, v. 8, p. 147-168, 1988.

PETER, A.M.B. **Composição botânica e química da dieta de bovinos, caprinos e ovinos em pastoreio associativo na caatinga nativa do semi-árido de Pernambuco**. 1992. 86 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1992.

PORTER, L.J.; HRSTICH, L.N.; CHAN, B.G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyaniding and delphinidin. **Phytochemistry**, Oxford, v. 25, p. 223-230, 1986.

PRINCE, M.L.; BUTLER, L.G. **Tannins and nutrition**. West Lafayette: University of Purdue, 1980. 37 p. (Report, 272).

PRIOLO, A.; WAGHORN, G.C.; LANZA, M.; BIONDI, L.; PENNISI, P. Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effect on lamb growth performance and meat quality. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 78, p. 810-816, 2000.

RUSSELL, R.W.; LOLLEY, J.R. Deactivation of high tannin milo by treatment with urea. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 72, p. 2427-2730, 1989.

RAYUDU, G.V.N.; KADIRVEL, R.; VOHRA, P.V.; KRATZER, F.H. Effect of various agents in alleviating the toxicity of tannic acid for chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 49, p. 1323-1326, 1970.

REED, J.D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 75, p. 1516-1528, 1995.

RITTNER, U.; REED, J.D. Phenolics and *in vitro* degradability of protein and fiber in West African browse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 58, p. 21–28, 1992.

SALUNKHE, D.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary tannins: Consequences and remedies**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p. 1-310.

SAS INSTITUTE. **The SAS system for windows**. Release 8.01. Cary, 2000.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 21-40, 2001.

SELINGER, L.B.; FOSBERG, C.W.; CHENG, K.J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. **Anaerobe**, v. 2, p. 263-284, 1996.

SHAYO, C.M.; UDÉN, P. Nutritional uniformity of crude protein fraction in some tropical browse plants estimated by two *in vitro* methods. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 78, p. 141–151, 1999.

SILANIKOVE, N.; PEREVOLOTSKY, A.; PROVENZA, F.D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannin and their negative postingestive effects in ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 69-81, 2001.

SILANIKOVE, N.; SHINDER, D.; GILBOA, N.; EYAL, M.; NITSAN, Z. Binding of polyethylene glycol to samples of forage plants as an assay of tannins and their negative effects on ruminal degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, p. 3230-3234, 1996.

SPRINKLE, J.; GRUMBLES, R.; MEEN, A. **Nutritional characteristics of Arizona browses**. Tucson: Cooperative Extension, College of Agriculture & Life Sciences, University of Arizona, 2002. Disponível em: <<http://cals.arizona.edu/pubs/animal/az1273/>>. 22/02/2005

STEWART, J.L.; MOULD, F.; MUELLER-HARVEY, I. The effect of drying treatment on the fodder quality and tannin content of two provenances of *Calliandra calothyrsus* Meissner. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 1461-1468, 2000.

TAO, S.; CLARA, K.W.; SCHRIMPF, J.; SATHE, E.; SHRIDHAR, K. Processing effect on walnut (*Juglans regia* L.) tannins. 2<sup>nd</sup> International electronic conference on synthetic organic chemistry (ECSOC-2), 1-30 September, 1998 [dp 127]. <http://www.mdpi.org/ecsoc/>.

TERRIL, T.H.; WINDHAM, R.; EVANS, J.J.; HOVELAND, C.S. Effect of drying method and condensed tannin on detergent fiber analysis of *Sericea lespedeza*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 66, p. 337-343, 1994.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics to ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 48, p. 185-197, 1994.

VASCONCELOS, V.R. **Caracterização química e degradação de forrageiras do semi-árido brasileiro no rúmen de caprinos**. 1997. 85 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1997.

VENTURA, M.R.; CASTAÑON, J.I.R.; PIELTAIN, M.C.; FLORES, M.P. Nutritive value of forage shrubs: *Bituminaria bituminosa*, *Rumex lunaria*, *Acacia salicina*, *Cassia sturtii* and *Adenocarpus foliosus*. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 52, p. 13-18, 2004.

VILLALBA, J.J.; PROVENZA, F.D.; BANNER, R.E. Influence of macronutrients and polyethylene glycol on intake of a quebracho tannin diet by sheep and goats. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 80, p. 3154-3164, 2002.

VITTI, D.M.S.S.; ABDALLA, A.L.; BUENO, I.C.S.; SILVA FILHO, J.C.; COSTA, C.; BUENO, M.S.; NOZELLA, E.F.; LONGO, C.; VIEIRA, M.E.Q.; CABRAL FILHO, S.L.S.; GODOY, P.B.; MUELLER-HARVEY, I. Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 119, p. 345–361, 2005.

WAGHORN, G.C.; ULYATT, M.J.; JOHN, A.; FISHER, M.T. The effect of condensed tannins on the site of digestion of amino acids and other nutrients in sheep fed on *Lotus corniculatus* L. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 57, p. 115-126, 1987.

WINA, E.; TANGENDAJA, B.; SUSANA, I.W.R. Effects of chopping, and soaking in water, hydrochloric acidic and calcium hydroxide solutions on the nutritional value of *Acacia villosa* for goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 79-92, 2005.

ZHU, J.; FILLIPICH, L.J.; NG, J. Rumen involvement in sheep tannic acid metabolism. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v.37, p.436-440, 1995.