UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GISELE MARIA FAGUNDES

**Leguminosas taniníferas como estratégia nutricional na mitigação das
emissões de metano em bovinos e a interface animal-solo**

Pirassununga

2017

GISELE MARIA FAGUNDES

**Leguminosas taniníferas como estratégia nutricional na mitigação das
emissões de metano em bovinos e a interface animal-solo**
(versão corrigida)

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte
dos requisitos para a obtenção ao título
de doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Ives Cláudio da Silva
Bueno

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fagundes, Gisele Maria

F1561 Leguminosas taniníferas como estratégia nutricional
na mitigação das emissões de metano em bovinos e a
interface entre planta-animal-solo / Gisele Maria
Fagundes; orientador Ives Cláudio da Silva Bueno.

-- Pirassununga, 2017.

115 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. CE560.16.27.13. 2. CB420.4.3.2. 3.
CH712.6.1.1. 4. CB210.15.40. 5. CB420. I. da Silva
Bueno, Ives Cláudio, orient. II. Título.

GISELE MARIA FAGUNDES

Leguminosas taniníferas como estratégia nutricional na mitigação das emissões de metano em bovinos e a interface entre planta-animal-solo

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção ao título de doutor em Zootecnia.

Área de concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Data de aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Ives Cláudio da Silva Bueno – Presidente da Banca Examinadora
Prof. Dr. Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Orientador

Ciniro Costa
Prof. Dr. Universidade Estadual Paulista

Renata Helena Branco
Dr^a Instituto de Zootecnia - IZ

Ricardo Luiz Moro de Sousa
Prof. Dr. Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Sarita Bonagurio Gallo
Prof^a Dr^a Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Teresa Cristina Alves
Prof^a Dr^a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária –EMPRAPA

(Pecuária Sudeste)

*“Recomeçar é mais difícil que começar, pois requer a
coragem do início e a superação do fracasso”*

Flavia Barros

*“Eu gosto do impossível porque lá
a concorrência é menor”*

Walt Disney

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria e José

A minha irmã Denise

*Ao meu filho, maior amor da minha vida, João Lucas,
pelo amor, carinho e apoio durante a realização deste trabalho*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida, por seres meu refúgio na dor e pelas bênçãos de todos os dias.

À Universidade de São Paulo, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela oportunidade de realização deste projeto.

Ao CNPq e FAPESP pela concessão das bolsas de doutorado.

Aos meus familiares, pelo amor, educação, valores, ensinamentos, dedicação e apoio nos momentos difíceis; em especial a minha mãe pelos cuidados com o João para que fosse possível a realização deste trabalho.

Ao Professor Ives Cláudio da Silva Bueno, na qual eu tanto admiro, pela orientação, ensinamentos, confiança, atenção, correções, gentileza, humildade e amizade. Serei eternamente grata por ter me concedido a oportunidade de aprender e trabalhar com o senhor, mesmo tendo conhecimento da minha breve passagem pelo Cena; onde sei que, muitos, me fechariam as portas. Obrigada pelo enorme carinho e apoio prestados em uma das fases mais difíceis da minha vida. Já dizia o escritor Augusto Cury que o maior educador não é o que controla, mas o que liberta. Mais do que um mero transmissor de informações, fostes para mim um incentivador do raciocínio científico e exemplo de vida.

Ao Professor Ricardo Luiz Moro pela atenção e ensinamentos importantíssimos prestados sobre microbiologia molecular.

Ao Doutor Alexandre Berndt pela colaboração e gentileza de ceder alguns equipamentos para a realização de parte deste trabalho.

Ao Professor James Pierre Muir da Universidade A&M do Texas pela assistência e contribuição prestada na realização deste trabalho.

Ao professor Robert de Oliveira Macedo pela disponibilização do campo agrostológico para a coleta das leguminosas.

Ao Doutor Mateus Maldonado Carriero pela fundamental ajuda no desenvolvimento dos protocolos nas análises moleculares.

À todos os professores do Departamento de Zootecnia da FZEA que contribuíram para a minha formação profissional.

A técnica do Laboratório, Priscila Maldonado, pela atenção e disponibilidade.

À toda a equipe de pesquisa do Laboratório de Fermentabilidade Ruminal, Gabriela Benetel, Katiéli Welter, Flávia Melo, Paulo Méo Filho e Rafaela Vincenzi pela ajuda.

À todos os funcionários do confinamento da FZEA que colaboraram para a execução do trabalho a campo.

Aos estagiários, Elisa, Tatiane, Roberta, Caroline e Gabriela pela preciosa ajuda no trabalho a campo e análises laboratoriais.

À amiga Thais Brochado pelo companheirismo, apoio, ajuda e amizade.

Aos bovinos fistulados da FZEA que serviram como base para este estudo.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês muito obrigada!

“Grandes almas sempre encontraram forte oposição
de mentes medíocres”

Albert Einstein

“Instituições insensatas são aquelas que possuem uma total falta de planejamento estratégico e uma notória fraqueza de propósitos. Ao minimizarem os valores de mérito e defenderem ardorosamente o igualitarismo entre as pessoas, acabam tratando desiguais como iguais. Esses atributos as conduzem a uma tendência natural à anarquia, à mediocridade e à sua autodestruição.”

Pedro Malafaia

RESUMO

FAGUNDES, G.M. **Leguminosas taniníferas como estratégia nutricional na mitigação de metano em bovinos e a interface entre planta-animal-solo.** 2017.115f. Tese (doutorado) — Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade São Paulo, Pirassununga, 2017.

O Brasil ocupa uma posição de destaque na produção e exportação mundial de carne bovina. No entanto, devido a parcela de contribuição dos ruminantes nas emissões de metano no país, a pecuária brasileira vem sofrendo contínua pressão das comunidades internacionais; e possivelmente, no futuro, tais emissões, possam ser motivo para a criação de barreiras para a exportação mundial de nossa carne. Neste contexto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o efeito dos taninos como alternativa a moduladores químicos de fermentação ruminal sobre as emissões de metano da microbiota de bovinos de corte. Para isso, foram realizados quatro experimentos. No primeiro estudo, foi avaliado o efeito dos taninos condensados (TC) das espécies *Flemingia macrophylla*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*, *Desmodium ovalifolium*, *Macrotiloma axillare*, *Desmodium paniculatum* e *Lepedeza procumbens* em presença ou não de polietileno glicol (PEG), sobre os parâmetros ruminais através da técnica de produção de gases *in vitro*. Foram mensurados a produção de metano, as concentrações de amônia e de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), quantificações microbianas e cinética de degradação ruminal. As espécies *L. leucocephala*, *D. paniculatum* e *L. procumbens* reduziram a produção de metano *in vitro*. A população de *Ruminococcus flavefaciens*, arqueias metanogênicas e protozoários foi reduzida, enquanto que o número total de bactérias ruminais e *Fibrobacter succinogenes* foi elevado. No segundo experimento, foram mensurados consumo, digestibilidade, parâmetros ruminais, quantificação microbiana e emissão de metano em bovinos fistulados Nelore consumindo dietas contendo 0%, 1,25% e 2,5% de TC de extrato de acácia. A suplementação com taninos reduziu tanto o consumo como as emissões de metano diárias por animal. Os TC suprimiram diretamente a comunidade de arqueias metanogênicas e alteraram benéficamente as populações ruminais de *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e bactérias totais. No terceiro experimento, dejetos dos bovinos obtidos no ensaio *in vivo* foram acondicionados em biodigestores de

bancada para avaliação do efeito das fezes ricas em taninos sobre a produção de biogás e metano. O estudo mostrou que os taninos não tiveram efeito negativo sobre a produção do biogás a partir dos dejetos dos bovinos. No quarto experimento, foi realizado ensaio em casa de vegetação para a avaliação do efeito das fezes ricas em taninos condensados sobre a dinâmica da população microbiana do solo. Os taninos aumentaram a entrada de N fecal e alteraram a ciclagem de nutrientes e a dinâmica microbiana do solo. Nosso estudo mostrou que os taninos podem ser uma promissora alternativa nutricional a moduladores químicos na redução da metanogênese de bovinos de corte, contribuindo positivamente na relação solo-planta-animal e colaborando na sustentabilidade da pecuária em sistemas tropicais.

Palavras-chave: gases do efeito estufa; taninos; metanogênese; pecuária nacional; ruminantes; sustentabilidade

ABSTRACT

FAGUNDES, G.M. **Condensed tannins as nutritional strategy on methane mitigation from cattle and the animal-soil interface**. 2017. 115f. PhD. Thesis — Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade São Paulo, Pirassununga, 2017.

Brazil occupies a prominent position in cattle beef production and export in the world. However, due to the ruminant's contribution to methane emissions in the country, Brazilian livestock farming has been suffering continuous pressure from international communities; and possibly in the future, such emissions, may be grounds for creating barriers to the worldwide export of our meat. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of tannins on the methane emissions of rumen beef cattle microbiota as an alternative to chemical rumen modulators. For this, four experiments were performed. In the first assay, condensed tannins (CT) from *Flemingia macrophylla*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*, *Desmodium ovalifolium*, *Macrotiloma axillare*, *Desmodium paniculatum* and *Lespedeza procumbens* in the presence or not of polyethylene glycol (PEG) on the ruminal parameters in the *in vitro* gas production technique was evaluated. Methane production, concentrations of ammonia and short chain fatty acids (AGCC), microbial quantification and kinetics of ruminal degradation were measured. The species *L. leucocephala*, *D. paniculatum* and *L. procumbens* reduced the production of methane *in vitro*. The populations of *Ruminococcus flavefaciens*, methanogenic *archeas* and protozoa were reduced, while total number of ruminal bacteria and *Fibrobacter succinogenes* was increased. In the second experiment, intake, digestibility, ruminal parameters, microbial quantification and methane emission were evaluated in Nelore fistulated cattle consuming diets containing 0%, 1,25% and 2,5% TC of acacia extract. Tannin supplementation reduced both daily intake and methane emissions per animal. CT directly suppressed methanogenic *archeas* community and beneficially altered ruminal populations of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and total bacteria. In the third experiment, bovine manure from the *in vivo* assay was stored in bench scale biodigesters to assess the effect of tannin-rich feces on the production of biogas and methane. The study showed that tannins had no negative effect on the biogas production from the bovine

manure. In the fourth experiment, a greenhouse experiment was carried out to evaluate the effect of tannin-rich feces on the dynamics of soil microbial population. Tannins increased fecal N intake and altered nutrient cycling and soil microbial dynamics. Our study showed that tannins might be a promising nutritional alternative to chemical modulators in the reduction of methanogenesis of beef cattle, contributing positively to the soil-plant-animal relationship and collaborating on the sustainability of livestock farming in tropical systems.

Keywords: greenhouse gases; tannins; methanogenesis; national livestock; ruminants; sustainability

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Impactos da pecuária brasileira sobre as emissões dos gases do efeito estufa	2
2.2 Potenciais de sequestro de carbono em pastagens	3
2.3 Leguminosas como alternativa para a produção pecuária sustentável	4
2.4 O que são taninos?	5
2.5 O papel dos taninos na manipulação do ambiente ruminal	6
2.6 Contexto global do ecossistema	8
2.7 Interferência dos taninos sobre a dinâmica solo-planta	8
3 HIPÓTESE.....	10
4 OBJETIVOS	10
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO I - Leguminosas forrageiras taniníferas como estratégia de emissões de metano in vitro e suas implicações sobre a microbiota ruminal.....	17
1.1 INTRODUÇÃO	19
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1.2.1 Leguminosas investigadas	19
1.2.2 Determinação da composição química	20
1.2.3 Bioensaio de produção de gases <i>in vitro</i> das leguminosas	21

1.2.4 Ensaio biológico de reatividade dos taninos	22
1.2.5 Determinação do metano	23
1.2.6 Cinética de fermentação ruminal <i>in vitro</i> das leguminosas	23
1.2.7 Determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃)	24
1.2.8 Determinação do perfil de ácidos graxos de cadeia curta	24
1.2.9 Quantificações microbianas	24
1.2.9.1 Extração de DNA	24
1.2.9.2 PCR em tempo real	24
1.2.10 Análise Estatística	26
1.3 RESULTADOS	28
1.3.1 Reatividade das leguminosas	28
1.3.2 Ensaio de metanogênese	29
1.3.2.1 Degradabilidade e metano	29
1.3.2.2 AGCC, N-NH ₃ e quantificações microbianas	31
1.3.3 Ensaio de cinética de fermentação ruminal	36
1.3.3.1 Degradabilidade, AGCC, FP e N-NH ₃	36
1.3.3.3 Cinética de degradação	40
1.4 DISCUSSÃO	44
1.4.1 Bioensaio de metanogênese	44
1.4.2 Ensaio de cinética de degradação ruminal	49
1.5 CONCLUSÕES.....	51

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
 CAPÍTULO II – Taninos como moduladores naturais do rúmen para controlar a metanogênese do gado de corte zebu: amigos ou inimigos da produção de energia via biogás?.....	
2.1 INTRODUÇÃO	62
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	62
2.2.1 Área experimental	62
2.2.2 Dietas e delineamento experimental	63
2.2.3 Coletas realizadas e preparação das amostras	63
2.2.4 Mensurações das emissões de metano através da técnica SF ₆	64
2.2.5 Parâmetros ruminais	65
2.2.6 Ensaio de produção de biogás a partir dos dejetos dos bovinos	66
2.2.7 Composição química	67
2.2.8 Quantificações microbianas	68
2.2.9 Análise estatística	68
2.3 RESULTADOS	69
2.3.1 Consumo, digestibilidade e metano	69
2.3.2 Parâmetros Ruminais	70
2.3.3 Quantificações Microbianas	75
2.3.4 Biodigestores	79
2.4 DISCUSSÃO	79

2.5 CONCLUSÕES.....	84
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
CAPÍTULO III – Taninos como fezes bovinas e a dinâmica microbiana do solo: ambientalmente amigável.....	92
3.1 INTRODUÇÃO	94
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	94
3.2.1 Obtenção das fezes	94
3.2.2 Ensaio casa de vegetação	96
3.2.3 Quantificações microbiológicas	97
3.2.3.1 Extração de DNA	97
3.2.3.2 PCR em tempo real	97
3.2.4 Análise Estatística	101
3.3 RESULTADOS	102
3.4 DISCUSSÃO	108
3.5 CONCLUSÕES.....	111
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	115

1 INTRODUÇÃO

A agropecuária é uma atividade de extrema importância para o Brasil. A produção de carne bovina brasileira é a segunda maior do mundo e, atualmente, o país possui o maior rebanho comercial de bovinos (218 milhões de cabeças) e o segundo maior rebanho mundial, sendo o maior exportador de carne bovina (CARVALHO; DE ZEN, 2017).

Impulsionado pelo crescimento populacional e pelo aumento da demanda de alimentos, em 2016, mesmo em um ano de economia tão adversa, o PIB do agronegócio apresentou crescimento de 2,5 a 3%, sendo responsável por 23% do PIB brasileiro (CNA-2016). O que demonstra que o Brasil ocupa uma posição de destaque no fornecimento de diversos alimentos para o mercado mundial, especialmente no suprimento da demanda de proteína animal, e que o agronegócio brasileiro é o setor mais importante na economia do país.

No entanto, a maior parte da produção de carne bovina nacional é feita quase que exclusivamente em meio a pastagens em solos de baixa fertilidade, onde gramíneas de origem africana com baixo valor nutritivo, como *Urochloa* spp. (sinonímia para *Brachiaria* spp.) e *Panicum* spp. (FERRAZ; FELÍCIO, 2010) formam a principal base da dieta para os animais. Este fato contribui para que o Brasil se destaque também nas emissões de metano (CH₄) pelos ruminantes, pois animais sob esse tipo de dieta emitem mais metano que os alimentados com forragens temperadas de melhor qualidade (BUENO et al., 2015).

As emissões de metano além de representarem uma perda de energia digestível para o animal (até 15%) são uma ameaça ao meio ambiente (MAKKAR; VERCOE, 2007). O metano é um gás do grupo dos “gases do efeito estufa” e aproximadamente 70% da emissão está relacionado à atividade humana (MAKKAR; VERCOE, 2007). Os ruminantes domésticos (predominantemente bovinos) são responsáveis por 21 a 25% do total das emissões de metano na escala global; oriundos tanto da fermentação entérica (EPA, 2010) como também pelo seu manejo (LASCANO; CÁRDENAS, 2010).

Segundo o Relatório de Avaliação Nacional do Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (RAN1) de 2013, as emissões dos gases poluentes provenientes da agropecuária representam 35% das emissões do Brasil, sendo a maior parte

produzida pelo rebanho bovino e o manejo das culturas de soja, milho, cana-de-açúcar e arroz (PBMC, 2013). O relatório também destaca que provavelmente a agricultura será o setor da economia mais afetado pelas mudanças climáticas ao longo do século XXI.

Devido a isso, a pecuária brasileira vem sofrendo grande pressão das comunidades nacionais e internacionais em relação à sua contribuição para o aquecimento global. E possivelmente, no futuro, tais emissões provenientes da pecuária nacional possam ser motivo para a criação de barreiras para a exportação mundial de nossa carne. Assim, a busca por alternativas nutricionais para a redução de metano, viáveis para a nossa pecuária, através de estudos que envolvam a compreensão da interação planta-animal-solo de alguns biomas e regiões do Brasil são de extrema importância para o crescimento da economia nacional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Impactos da pecuária brasileira sobre as emissões dos gases do efeito estufa

No Brasil, cerca de 160 milhões de hectares de pastagens são utilizados na criação do maior rebanho comercial de bovino do mundo (IBGE, 2012). Essa grande demanda por pastos para tal atividade se deve à prática quase que exclusiva da criação de forma extensiva. O predomínio da pecuária bovina sob esse tipo de sistema intensifica os impactos ambientais gerados pelo desmatamento e pelas emissões de gases do efeito estufa.

No sistema extensivo de produção, os animais são mantidos durante todo o ano em pastagens naturais com pouca ou nenhuma suplementação (DICK et al., 2015). A produção de forragem neste tipo de sistema é fortemente afetada por variações climáticas, onde em certas épocas do ano, a baixa oferta de forragem aliada a problemas sanitários e reprodutivos fazem com que os animais criados sob este tipo de manejo, apesar do baixo custo, apresentem baixa eficiência produtiva e um tempo de permanência elevado (DICK et al., 2015).

Os gases emitidos dentro do sistema extensivo são o metano, que é naturalmente produzido pelo processo de fermentação ruminal e pela decomposição dos dejetos do animal, e o óxido nitroso, também proveniente da deposição dos dejetos (BERCHIELLI et al., 2012). Em termos globais, os ruminantes contribuem com 25% do total de metano produzido (EPA, 2010); no entanto, no Brasil, devido ao grande tamanho do rebanho, somente a categoria de bovino de corte corresponde a 80% (BRASIL-MCT, 2006). A alta emissão de metano por nossos bovinos tem sido uma das mais novas barreiras impostas à pecuária brasileira, nomeada como o “boi do metano” (PINEDA, 2010).

Atualmente, em decorrência da globalização e da intensificação dos prejuízos ambientais pela ação humana, tem-se notado uma urgente pressão da sociedade pela substituição do manejo de sistemas de produção insustentáveis por práticas sustentáveis. Informações banalizadas pela mídia contribuem para acentuar a imagem da carne bovina como a grande vilã do desenvolvimento sustentável (BERCHIELLI et al., 2012). O crescimento da devastação de áreas florestais na Amazônia divulgada em meios de comunicação é outra abordagem, frequentemente, atribuída à negativa imagem da pecuária brasileira (BERCHIELLI et al., 2012).

Dessa forma, o cultivo de pastagens para a produção de carne é constantemente associado ao mau uso do solo, desmatamento de florestas e aquecimento global. A intensificação dos sistemas de produção é uma das alternativas indicadas para minimizar os impactos gerados pelo sistema extensivo; pois diminui o desmatamento para novas áreas de produção (BARCELLOS et al., 2008), reduz as emissões de metano como consequência do aumento da eficiência do sistema, e por conseguinte, obtém-se um balanço positivo entre sequestro de carbono por pastagens e emissões.

2.2 Potenciais de sequestro de carbono em pastagens

Apesar da pecuária bovina brasileira ser acusada constantemente pela mídia como uma das causadoras do efeito estufa, essa imagem negativa pode ser revertida através da promoção do sequestro de carbono realizado pelas pastagens.

Estudos relatam que o tipo de manejo influencia na quantidade de carbono acumulado ou perdido pela pastagem (CERRI et al., 2003; GARCIA-OLIVA et al., 2006; MAIA et al., 2009). Em investigação experimental sobre o efeito do manejo de

pastagens sobre o potencial de sequestro de carbono do solo, Maia et al. (2009) afirmaram que pastagens brasileiras localizadas nos estados de Rondônia e Mato Grosso, quando bem manejadas ou melhoradas, possuem potencial de sequestrar carbono. Os mesmos autores relataram que pastagens degradadas resultam em perda média de 0,28 Mg C ha/ano; no entanto, a adoção de práticas de manejo adequadas nestes sistemas reverteria as perdas de C.

Assim, conforme relatado, a substituição de práticas insustentáveis de cultivo de pasto, por práticas adequadas de manejo que propõem a manutenção e acúmulo de C no sistema solo-planta podem atenuar os efeitos do aquecimento global (CARVALHO et al., 2010).

2.3 Leguminosas como alternativa para a produção pecuária sustentável

Existe uma diversidade de espécies de plantas herbáceas e arbustivas que podem ser consumidas por herbívoros. Contudo, observam-se poucas variedades utilizadas como forrageiras para a criação animal. Em ambientes tropicais, espécies de gramíneas de origem africana são as mais utilizadas para o pastejo, e mais raramente quando ocorre o consórcio de pastagem, alguns gêneros de leguminosas herbáceas provenientes da América do Sul (*Stylosanthes* ou *Arachis*) são empregadas; no entanto, gêneros de herbáceas como *Desmodium* e *Centrosema*, e de arbustivas como *Cajanus*, *Leucaena* e *Cratylia*, têm o uso como forrageira bem menos frequente (VALLE et al., 2009).

A atual conscientização mundial sobre o aquecimento global tem impulsionado a busca por alimentos alternativos na criação animal e a reconsideração de algumas práticas de manejo. Assim, a vasta biodiversidade de leguminosas ainda não exploradas como forrageiras pode se tornar uma significativa alternativa a ser utilizada na dieta dos ruminantes (FAGUNDES et al., 2014) em países em expansão produtiva, como o Brasil, pois se trata de uma ferramenta vital para o manejo sustentável da produção animal.

De forma geral, o fator que mais influencia a produtividade das pastagens é a adubação nitrogenada, pois o nitrogênio é o nutriente mais limitante ao crescimento das plantas (FAGUNDES et al., 2012). A formação de pastagens consorciadas com leguminosas, em face de capacidade de fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico desta última, é uma alternativa para adicionar N ao sistema, além de proporcionar

melhoria da qualidade nutricional da forragem e o melhor aproveitamento de nutrientes conseguido através de um sistema radicular, capaz de extrair nutrientes em camadas mais profundas do solo, os quais serão disponibilizados após sua decomposição e incorporação (FAGUNDES et al., 2012).

Dentre as vantagens da utilização das leguminosas em relação às gramíneas na alimentação animal podem ser citadas a manutenção da qualidade bromatológica ao longo das estações do ano, o incremento e ou manutenção de fonte de matéria seca (MS) para período de escassez de gramíneas, o incremento de nitrogênio para o solo, melhora dos índices produtivos devido à melhora da dieta, incremento de proteína e minerais (cálcio e magnésio), aumento do consumo e digestibilidade das gramíneas com o maior aporte de PB na seca, redução na pressão ambiental devido à menor utilização de fertilizantes químicos e diminuição na degradação das pastagens pela melhoria física e química do solo (NEPOMUCENO, 2009).

Além das inúmeras vantagens relatadas, algumas espécies de leguminosas são ricas em compostos fenólicos, como os taninos. Vários estudos têm demonstrado que leguminosas temperadas (*Hedysarium coronarium*, *Lespedeza cuneata*, *Lotus corniculatus* e *L. uliginosus*) e leguminosas tropicais (*Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*) são fontes de taninos condensados (TC) e podem vir a reduzir a metanogênese quando utilizadas em concentrações moderadas na dieta de ruminantes (LASCANO; CÁRDENAS, 2010; PATRA; SAXENA, 2011; BUENO et al., 2015). Desse modo, as emissões de metano pela agropecuária nacional podem ser atenuadas através de técnicas de manejo nutricional, como a introdução de plantas forrageiras taniníferas na alimentação dos animais.

2.4 O que são taninos?

Muitas espécies de plantas apresentam inúmeros metabólitos especiais ou secundários que abrangem grandes classes, como as substâncias fenólicas, alcaloides e terpenoides. Dentre as substâncias fenólicas, destacam-se os taninos, polifenóis encontrados em sementes, madeiras, folhas e cascas de frutas em diversas plantas gimnospermas e angiospermas (FAGUNDES et al., 2014). Os taninos atuam como defensores das plantas contra o ataque de herbívoros e patógenos tornando seu sabor desagradável (MUIR, 2011).

Na célula vegetal, os taninos podem ser encontrados no vacúolo, citoplasma e parede celular (FAGUNDES et al., 2014). Normalmente, são classificados em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (MLAMBO; MAPIYE, 2015).

Os taninos condensados (TC) são substâncias formadas pela polimerização de unidades de flavonoides, geralmente flavan-3-óis e/ou flavan-3,4-dióis. Esses taninos também são denominados de proantocianidinas (PATRA; SAXENA, 2011), pois podem ser hidrolisados por ácidos fortes a antocianidinas.

Dependendo da natureza química e da concentração, os taninos exercem atividades anti-helmíntica, antimicrobiana e antioxidante em ruminantes, influenciando em diversos efeitos fisiológicos, tais como, metabolismo do nitrogênio, população microbiana do rúmen, consumo, desempenho dos animais e na ecologia de parasitas internos, afetando positivamente o bem-estar animal e a qualidade dos produtos oriundos pelos ruminantes para o consumo humano (PATRA; SAXENA, 2011; LUCIANO et al., 2011; FAGUNDES et al., 2014; MLAMBO; MAPIYE, 2015).

Vários fatores como temperatura, intensidade de luz, água, estresse, nutrientes do solo, qualidade do solo, topografia e herbivoria influenciam a concentração e a mistura das diferentes unidades de monômeros dos taninos nas plantas, ocorrendo variações também em uma mesma planta ao longo do ano. A grande diversidade dos tipos de taninos e a grande variação entre as espécies de plantas como também em uma mesma espécie, compreendem justamente o grande desafio para que os pesquisadores da área consigam chegar a uma resposta biológica eficaz. Assim, tal complexidade de respostas tem despertado o crescente interesse de estudos na área para que se alcance o conhecimento entre estrutura química (unidade de monômeros) e bioatividade dos monômeros dos taninos isoladamente.

2.5 O papel dos taninos na manipulação do ambiente ruminal

Historicamente, no processo evolutivo, relações entre herbívoro e planta foram fundamentais para a biodiversidade das espécies de plantas, juntamente com a vasta variedade de metabólitos secundários produzidos por elas. Assim, herbívoros ruminantes e plantas taniníferas coevoluem e interagem entre si ao longo de muitos anos (VAN SOEST, 1994).

Ao precipitarem proteínas, os taninos, resultam em efeito antimicrobiano e antifúngico, onde a inibição bacteriana pode ser causada por vários mecanismos, tais como desestabilização e permeabilização da membrana citoplasmática, inibição de enzimas extracelulares microbianas, ações diretas sobre o metabolismo microbiano, ou a privação de substratos necessários para o crescimento microbiano, incluindo micronutrientes como ferro e zinco (via precipitação de metais) (DAGLIA, 2012).

Até pouco tempo atrás, havia um grande interesse em estudos nutricionais que focassem no uso de antimicrobianos no rúmen, como a monensina sódica, para a redução de metano (RIBEIRO PEREIRA, 2013). Todavia, a atual pressão da sociedade contra a utilização de ionóforos na dieta animal tem incentivado a busca por métodos alternativos para a manipulação do ambiente ruminal (RIBEIRO PEREIRA, 2013). As propriedades antimicrobianas dos taninos permitem com que esse metabólito secundário seja uma alternativa natural à utilização de aditivos químicos na manipulação do ecossistema ruminal (RIBEIRO PEREIRA, 2013).

Dentre os principais efeitos dos taninos sobre a microbiota ruminal, inclui-se a ação bacteriostática, dificultando a adesão pelos microrganismos na parede celular (PATRA; SAXENA, 2011; BUENO et al., 2015), reduzindo a população de bactérias celulolíticas e contribuindo para a redução da metanogênese (BUENO et al., 2015). Em ensaio experimental com leguminosas do semiárido nordestino, Guimarães-Beelen et al. (2006) observaram que a exposição de culturas de *Ruminococcus flavefaciens* a taninos de *Mimosa hostilis* e de *Bauhinia cheilantha* inibiu drasticamente o crescimento bacteriano, sendo esta população menos afetada pelo teor de tanino da leguminosa *Mimosa caesalpinifolia*, quando em baixa concentração. Estes mesmos autores verificaram que a concentração de 50 µg/mL do tanino de *M. hostilis* e de *B. cheilantha* é suficiente para reduzir o crescimento de *R. flavefaciens* em 80 e 78%, respectivamente, contra apenas 24 % para o tanino de *M. caesalpinifolia*.

Efeitos dos TC sobre a população de protozoários do rúmen também têm sido relatados na literatura (MARTINELE et al., 2010; PATRA; SAXENA, 2011; BODAS et al., 2012, BHATTA et al., 2013). Bhatta et al. (2013) verificaram que das 21 plantas taniníferas estudadas, 12 espécies reduziram a população de *Entodinia* e 7 espécies diminuíram a população de *Holotricha*. Esses mesmos autores concluíram que a população de protozoários *Entodinia* parece ser mais susceptível a ação dos

taninos. Martinele et al. (2010), ao estudarem o efeito de algumas espécies de plantas nativas do cerrado, também verificaram uma redução no número de protozoários ciliados, principalmente na população de *Entodinia*. No entanto, apesar das constantes inibições relatadas em determinados estudos, ainda hoje não se conhece o exato efeito deletério dos taninos sobre a população de protozoários no rúmen.

Em geral, os efeitos inibitórios dos taninos sobre a metanogênese no rúmen são atribuídos a efeitos diretos sobre arqueias metanogênicas e protozoários, e indiretamente através da supressão do crescimento de bactérias celulolíticas ocasionando menor degradação da fibra (PATRA; SAXENA, 2011). Bhatta et al. (2013) relataram que espécies taniníferas como a *C. inerme*, *G. sylvestre* e *S. laurifolia* possuem potencial para supressão da metanogênese *in vitro*. A redução da emissão de metano por leguminosas taniníferas também foi relatada recentemente por Hassanat e Benchaar (2013); Naumann et al. (2013), Anantasook et al. (2014) e Bueno et al. (2015).

2.6 Contexto global do ecossistema

Estudos que estabelecem uma visão global do ecossistema podem criar condições para tornar a produção animal mais econômica e ecologicamente sustentável (SANTOS et al., 2002). A criação de bovinos em sistemas extensivos envolve uma relação solo-planta-animal, sendo importante que os estudos verifiquem também como o manejo e pastejo animal afetam o solo e outros componentes do meio ambiente (SANTOS et al., 2002).

Quase a totalidade das pesquisas para a mitigação de metano em ruminantes não consideram o sistema de produção animal como parte de um todo. Desse modo, não relatam e nem investigam possíveis alterações na dinâmica solo-planta-animal causadas por determinada estratégia de mitigação adotada; pois de nada adianta um modelo de redução de metano que irá ocasionar outros tipos de impactos negativos para o meio ambiente.

2.7 Interferência dos taninos sobre a dinâmica solo-planta

A composição da dieta dos ruminantes influencia a química e as características físicas do solo (MUIR, 2011). Como exemplo, solos que recebem fezes provenientes de dietas de baixo teor de proteína contribuem com menos nitrogênio para o crescimento das plantas no solo, com consequentes inferiores valores da relação N:C (POWELL et al., 2006). Constata-se, portanto, que fezes com TC podem afetar os solos de tal forma que o desenvolvimento vegetal irá refletir na dieta dos ruminantes originais (Figura 1). Da mesma forma, plantas ricas em TC também irão se decompor em diferentes taxas, com consequências para a composição mineral do solo (KRAUS et al., 2003). Tscherning et al. (2005) verificaram que plantas com complexos de lignina:TC e N:TC influenciam a decomposição aeróbia do material vegetal.

Figura 1 – Interações dos taninos na alimentação de ruminantes sobre os decompositores do solo.

Fonte: Esquema baseado no texto de Muir (2011).

As condições do solo também afetam a relação de TC com os nutrientes do solo (JOANISEE et al., 2007; MUIR, 2011; SCHMIDT et al., 2012). Wang et al. (1996), ao estudarem planta rica em TC adicionada a cama de frango, observaram apenas uma pequena redução na decomposição da MS e N. Os mesmos autores verificaram ainda que os TC desapareceram quase tão rapidamente quanto a MS. Outros descobriram que populações microbianas, concentrações de minerais, temperaturas, exposição de solo e água, entre outros fatores, afetam a decomposição da planta com TC no solo (HYDER et al., 2005; SCHMIDT et al., 2012). As complexas ligações formadas pelos TC são afetadas principalmente pelo

pH, seja no solo, como também no trato gastrointestinal dos ruminantes. Tais variáveis provavelmente irão influenciar nos níveis de atividade dos microrganismos do solo, como estirpes fúngicas, que podem degradar TC.

Neste aspecto, a exploração de plantas taniníferas como forrageiras para ruminantes bem como a avaliação do valor nutritivo e a influência na microbiota ruminal e do solo poderão auxiliar no desenvolvimento de estratégias nutricionais sustentáveis que minimizem as emissões de metano pelos ruminantes e assegurem o desenvolvimento da pecuária nacional de carne e leite.

3 HIPÓTESE

Diante do exposto, a hipótese a ser testada é que leguminosas taniníferas possuem atividade antimicrobiana e, quando utilizadas como estratégia nutricional na dieta de bovinos, reduzem as emissões de metano proveniente da microbiota ruminal; consequentemente, a eliminação de fezes ricas em TC proveniente dos animais alimentados com estas forrageiras alteram a dinâmica de nutrientes do solo.

4 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi identificar leguminosas taniníferas forrageiras capazes de reduzir a produção de metano proveniente da fermentação *in vitro* da microbiota de bovinos de corte e, o subsequente impacto sobre a adoção de tal estratégia nutricional sobre a produção de metano *in vivo* e a população microbiana do solo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANTASOOK, N.; WANAPAT, M.; CHERDTHONG, A. Manipulation of ruminal fermentation and methane production by supplementation of rain tree pod meal containing tannins and saponins in growing dairy steers. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.98, p.50-55, 2014.

BARCELLOS, A.O.; RAMOS, A.K.B.; VILELA, L.; MARTHA JUNIOR, G.B. Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.51-67, 2008 (supl. especial).

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

BHATTA, R.; BARUAH, L.; SARAVANAN, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis *in vitro*. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.97, p.446-456, 2013.

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

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Relatórios de referência: **Emissões de metano pela pecuária**. In: Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa, Brasília: MCT, 2006, 77p.

BUENO, I.C.S.; BRANDI, R.A.; FRANZOLIN, R.; FAGUNDES, G.M.; BENETEL, G.; ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; MUIR, J. P. Comparative *in vitro* methane

production and antimethanogenic effect of tannins in five ruminant species. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p.1-9, 2015.

CARVALHO, J.L.; AVANZI, J.C.; SILVA, M.L.; DE MELLO, C.R.; CERRI, C.E. Potential of soil carbon sequestration in different biomes of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, p.277-289, 2010.

CERRI, C.E.P.; COLEMAN, K.; JENKINSON, D.S.; BERNOUX, M.; VICTORIA, R.L. CERRI, C.C. Modeling soil carbon from forest and pasture ecosystems of Amazon, Brazil. **Soil Science Society of American Journal**, v.67, p.1879-1887, 2003.

CNA. Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil. **PIB e Performance do Agronegócio** – Balanço 2016. Brasília: CNA, 2016.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in Biotechnology**, v.23, p.174-181, 2012.

DICK, M.; SILVA, M.A.; DEWES, H. Life cycle assessment of beef cattle production in two typical grassland systems of southern Brazil. **Journal of Cleaner Production**, v. 96, p.426-434, 2015.

EPA. Inventory of U.S. **greenhouse gas emissions and sinks: 1990-2008**. U.S. EPA: Washington DC, 2010, capítulo 6 p.6.1-6.7

FAGUNDES, G. M.; MODESTO, E. C.; FONSECA, C. E. M.; LIMA, H. R. P.; MUIR, J.P. Intake, digestibility and milk yield in goats fed *Flemingia macrophylla* with or without polyethylene glycol. **Small Ruminant Research**, v.116, p.88-93, 2014.

FAGUNDES, G. M.; SOARES, J.P.G.; LEAL, M.A.A.; GUERRA, J.G.M.; COSTA, J. R. Produção e valor nutritivo de pastagens orgânicas de capim tanzânia (*Panicum maximum* Jacq cv. Tanzânia) em monocultivo e consorciado com calopogônio (*Calopogonium muconoides* Desv.) para rebanho leiteiro.

Seropédica-RJ: (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 89), 2012 (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento).

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. Production systems—An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238-243, 2010.

GARCIA-OLIVA, F.; LANCHO, J.F.G.; MONTANO, N.M.; ISLAS, P. Soil carbon and nitrogen dynamics followed by a forest-to-pasture conversion in western Mexico. **Agroforestry Systems**, v.66, p. 93–100, 2006.

GUIMARÃES-BEELLEN, P.M; BERCHIELLE, T.T.; BUDDINGTON, R.; BEELLEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.910-917, 2006.

HASSANAT, F.; BENCHAAR, C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production *in vitro*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.332-339, 2013.

HYDER, P.W.; FREDRICKSON, E.L.; ESTELL, R.E.; LUCERO, M.E.; REMMENG, M.D. Loss of phenolic compounds from leaf litter of creosotebush [*Larrea tridentata* (Sess. & Moc. Ex DC.) Cov.] and tarbush (*Flourensia cernua* DC.). **Journal of Arid Environments**, v. 61, p.79–91, 2005.

IBGE, 2012. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. <http://www.ibge.gov.br/home/>

JOANISSE, G. D.; BRADLEY, R. L.; PRESTON, C. M.; MUNSON, A. D. Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: the case of *Kalmia angustifolia*. **New Phytologist**, v. 175, p. 535-546, 2007.

KRAUS, T.E.C.; DAHLGREN, R.A.; ZOSOZKI, R.J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems—a review. **Plant Soil**, v.256, p.41–66, 2003.

LASCANO, C. E.; CÁRDENAS, E. Alternatives for methane emission mitigation in livestock systems. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39 (supl. especial), p.175-182, 2010.

LUCIANO, G.; VASTA, V.; MONAHAN, F.J; LÓPEZ-ANDRÉS, P.; BIONDI, L.; LANZA, M.; PRIOLO, A. Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of *Longissimus dorsi* muscle from lambs fed a tannin-containing diet. **Food Chemistry**, v.124, p.1036-1042, 2011.

MAIA, S.M.F.; OGLE, S.M.; CERRI, C.E.P.; CERRI, C.C. Effect of grassland management on soil carbon sequestration in Rondônia and Mato Grosso states, Brazil. **Geoderma**, v.149, p. 84–91, 2009.

MAKKAR, H.P.S.; VERCOE, P.E. **Measuring methane production from ruminants**. Dordrecht: Springer, 2007. p.138.

MARTINELE, I.; SANTOS, G.R.A.; MATOS, D.S.; A, BATISTA, A.M.V.B.; D'AGOSTO, M. Diet botanical composition and rumen protozoa of sheep in Brazilian semi-arid area. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.169-175, 2010.

MLAMBO, V.; MAPIYE, C. Towards household food and nutrition security in semiarid areas: What role for condensed tannin-rich ruminant feedstuffs? **Food Research International**, v.76, p.953-961, 2015.

MUIR, J. P. The multi-faceted role of condensed tannins in the goat ecosystem. **Small Ruminant Research**, v. 98, p.115–120, 2011.

NAUMANN, H. D.; TEDESCHI, L. O.; MUIR, J. P.; LAMBERT, B. D.; KOTHMANN, M. M. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane production *in vitro*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.50, p.154-162, 2013.

NEPOMUCENO, D.D. **Fatores antinutricionais em três espécies de leguminosas forrageiras**. 2009. 66f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Área de Concentração de Produção Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.24-37, 2011.

PBMC, 2013. Painel Brasileiro de Mudanças Climáticas (in Portuguese). <http://www.pbmc.coppe.ufrj.br/>

PINEDA, N. O metano e o boi brasileiro. **Revista DBO**, p.84-85, 2010.

POWELL, J.M.; WATTIAUX, M.A.; BRODERICK, G.A.; MOREIRA, V.R.; CASLER, M.D. Dairy diet impacts on fecal chemical properties and nitrogen cycling in soils. **Soil Science**, v.70, p.786–794, 2006.

RIBEIRO PEREIRA, L.G. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**, v. 26, p. 264-277, 2013.

SCHMIDT, M. A.; HALVORSON, J. J.; GONZALEZ, J. M.; HAGERMAN, A. E. Kinetics and binding capacity of six soils for structurally defined hydrolyzable and condensed tannins and related phenols. **Journal of Soils and Sediments**, v.12, p.366-375, 2012.

TSCHERNING, K.; BARRIOS, E.; LASCANO, C.; PETERS, M.; SHULTZ-KRAFT, R. Effects of sample post-harvest treatment on aerobic decomposition and anaerobic in-vitro digestion of tropical legumes with contrasting quality. **Plant Soil**, v.269, p.159–170, 2005.

VALLE, C.B.; JANK, L.; RESENDE, R.M.S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v.56, p.460-472, 2009.

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

WANG, Z.S.; GOETSCH, A.L.; PARK, K.K.; PATIL, A.R.; KOUAKOU, B.; GALLOWAY SR., D.L.; ROSSI, J.E. Addition of condensed tannin sources to broiler litter before deep-stacking. **Journal of Applied Animal Research**, v.10, p.59–79, 1996.

CAPÍTULO I

Leguminosas forrageiras taniníferas como estratégia de mitigação das emissões de metano *in vitro* e suas implicações sobre a microbiota ruminal

RESUMO

O metano emitido nos sistemas de criação de ruminantes contribui para o efeito estufa e suas consequências negativas sobre o meio ambiente, o que justifica a criação de estratégias nutricionais para mitigar as emissões nesses sistemas. O objetivo do estudo foi identificar os efeitos dos taninos condensados (TC) das espécies *Flemingia macrophylla*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*, *Desmodium ovalifolium*, *Macrotyloma axillare*, *Desmodium paniculatum* e *Lepedeza procumbens* sobre a ecologia ruminal da microbiota de bovinos de corte e as emissões de metano *in vitro*. Como doadores de inóculo, foram utilizados quatro bovinos adultos Nelore, fistulados no rúmen, sob pastejo. A análise quantitativa da reação em cadeia da polimerase em tempo real revelou que os taninos reduziram ($P \leq 0,05$) as populações de *Ruminococcus flavefaciens*, arqueias metanogênicas e protozoários, enquanto que o número total de bactérias ruminais foi elevado. Nosso estudo também mostrou uma relação positiva ($P \leq 0,05$) entre taninos e *Fibrobacter succinogenes*. As espécies *L. leucocephala*, *D. paniculatum* e *L. procumbens* resultaram menores ($P \leq 0,05$) teores de isoácidos e produção de metano. As três leguminosas possuem potencial para mitigação de metano em ruminantes. No entanto, a fermentação da leguminosa *L. leucephala* resultou em maiores porcentagens de degradabilidade *in vitro* do que as outras duas espécies.

Palavras-chave: arbustos, leguminosas, metanogênese, compostos fenólicos, polifenóis, ruminantes, sustentabilidade

CHAPTER I

Tannin-rich legume forages as a mitigation strategy to reduce methane *in vitro* and implications for rumen microbiota

ABSTRACT

Methane from ruminant livestock systems contributes to the greenhouse effect on the environment, which justifies the creation of feed strategies to mitigate emissions from these systems. We investigated the effects of the condensed tannin (CT)-rich legumes *Flemingia macrophylla*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*, *Desmodium ovalifolium*, *Macrotyloma axillare*, *Desmodium paniculatum* and *Lespedeza procumbens* on *in vitro* methane emissions and rumen microbiota ecology in beef cattle. Four adult rumen-cannulated Nelore cattle grazing a tropical grass pasture were used as inoculum donors. Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis revealed that the abundance of *Ruminococcus flavefaciens*, methanogenic archaea and protozoa populations were reduced ($P \leq 0.05$) whereas total ruminal bacteria were enhanced in the presence of CT. Our study also revealed a positive ($P \leq 0.05$) relationship between CT and *Fibrobacter succinogenes*. Reactive CT from *L. leucocephala*, *D. paniculatum* and *L. procumbens* resulted in decreased ($P \leq 0.05$) isoacid content and methane production. *Leucaena leucocephala*, *D. paniculatum* and *L. procumbens* have the potential to suppress rumen methanogenesis. However, *in vitro* fermentation of *L. leucocephala* resulted in greater ($P \leq 0.05$) degradability percentages than the other two species.

Keywords: browse, legumes, methanogenesis, phenolic compounds, polyphenolics, ruminants, sustainability

1.1 INTRODUÇÃO

O setor pecuário contribui com 25% do total das emissões de metano produzidas (EPA, 2010); no entanto, em condições de pastagem, sua contribuição para o aquecimento global pode ser muito mais abrangente (KNAPP et al., 2014). O consenso em torno de mudança climática tem impulsionado a busca por estratégias nutricionais para reduzir as emissões de metano na produção de ruminantes e, ao mesmo tempo reconsiderar algumas práticas de manejo.

Em ambientes tropicais, como o Brasil, as gramíneas de origem africana são as espécies mais comuns para pastoreio de gado (VALLE et al., 2009), e resultam em baixa produtividade pecuária e aumento das emissões de metano (BUENO et al., 2015). Além disso, os animais Zebu, pastejadores menos eficientes que os taurinos, emitem mais metano (BUENO et al., 2015) sendo o gado predominante no cenário da pecuária brasileira. E devido à grande extensão do rebanho bovino nacional, somente a categoria de corte participa com 80% das emissões de metano (BRASIL-MCT, 2006).

Diversas leguminosas herbáceas, arbóreas e arbustivas, ainda pouco conhecidas, mal exploradas e que apresentam numerosos compostos fenólicos, como os taninos, podem alterar benéficamente a microbiota ruminal e diminuir a produção de CH₄ do setor pecuário. As propriedades antimicrobianas dos taninos os tornam uma alternativa natural a aditivos químicos utilizados para a manipulação do ecossistema do rúmen (TEDESCHI et al., 2014) nos animais do setor pecuário. Assim, o objetivo do estudo foi investigar o efeito de dez espécies de leguminosas ricas em taninos sobre as emissões de metano *in vitro* e alterações na ecologia microbiana do rúmen de bovinos Nelore.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Leguminosas investigadas

Foram utilizadas dez leguminosas taniníferas exóticas ricas consumidas por ruminantes, sendo elas: *Flemingia macrophylla*, *Leucaena leucocephala*, *Stylosanthes guianensis*, *Gliricidia sepium*, *Cratylia argentea*, *Cajanus cajan*,

Desmodium ovalifolium e *Macrotiloma axilare* de ambiente tropical e *Desmodium paniculatum* e *Lespedeza procumbens* de ambiente temperado. As espécies *F. macrophylla*, *G. sepium* e *L. leucocephala* foram coletadas no Sistema Integrado de Produção Agroecológica pertencente a Embrapa Agrobiologia, a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (Pesagro-Rio) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As demais leguminosas de ambiente tropical foram coletadas no campo agrostológico da UFRRJ. As espécies *D. paniculatum* e *L. procumbens*, de ambiente temperado, foram fornecidas pelo centro de pesquisa Texas AgriLife Research da Texas A&M University. O feno do capim Tifton 85 (*Cynodon* spp.) e a alfafa (*Medicago sativa*) obtidos pelo comércio local foram utilizados como espécies controle.

Em outubro de 2012 foram coletadas cinco áreas de tamanho 0,5 m x 0,5 m (0,25 m²) em pontos diferentes. As espécies arbóreas e arbustivas foram cortadas a partir de 1,00 m de altura do solo, e as espécies rasteiras rentes ao solo. Após a coleta a campo, as leguminosas foram pesadas, e todo o material proveniente dos cinco pontos coletados foi misturado, homogeneizado e seco em estufa de ventilação forçada à temperatura de 40°C (para não inativar os taninos) durante 72 h. Após o procedimento de secagem e pesagem, o material foi moído a 0,25 mm para as análises de fenóis e taninos e a 1 mm para as análises bromatológicas e incubações *in vitro*.

1.2.2 Determinação da composição química

As análises de composição química das leguminosas foram realizadas no laboratório de Bromatologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo (USP), em Pirassununga, São Paulo, Brasil. Os teores de matéria seca (MS) (ID 930.15), matéria mineral (MM) (ID 942.05), extrato etéreo (EE) (ID 920.19) e fibras em detergente ácido (FDA) (ID 973.18) das plantas foram determinados de acordo com AOAC (1998). As análises para determinação dos teores de fibras em detergente neutro (FDN) e de lignina foram realizadas segundo metodologia proposta por Mertens (2002). As determinações de proteína bruta (PB) (ID 954.01) foram efetuadas de acordo com o método micro Kjeldahl (AOAC, 1998). Os teores de fenóis e taninos totais foram realizados de acordo com Makkar et al. (1993) e Makkar (2003) e as determinações das frações

de TC realizados de acordo com a metodologia Terril et al. (1992). Foram criados padrões específicos para cada espécie de planta analisada usando extratos de TC purificados em Sephadex LH-20 e liofilizados para recuperação dos TC purificados. A composição química das plantas está descrita na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Composição química das plantas avaliadas (g/kg MS)

Plantas	PB*	EE	FDN	FDA	Lig	FT ^a	TT ^a	TC ^b	TCL	TCP	TCF
<i>Cajanus cajan</i>	200	38	552	438	191	50	39	84	30	55	0
<i>Cynodon spp (Tifton 85)</i>	138	13	743	306	133	n.d ^b	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>Cratylia argentea</i>	195	18	577	418	164	36	21	34	0	29	0,04
<i>Desmodium ovalifolium</i>	112	12	614	490	176	237	223	82	52	29	0
<i>Desmodium paniculatum</i>	162	20	515	414	216	171	154	187	85	100	0,02
<i>Flemingia macrophylla</i>	189	16	577	465	229	181	168	203	78	116	0,1
<i>Gliricidia sepium</i>	281	23	441	277	130	45	28	78	51	14	14
<i>Lespedeza procumbens</i>	141	20	475	349	161	108	87	143	87	56	0
<i>Leucaena leucocephala</i>	263	22	444	271	136	258	229	72	41	32	0
<i>Medicago sativa</i>	271	84	448	245	127	14	8	0,2	n.d	n.d	n.d
<i>Macrotiloma axillare</i>	208	22	523	377	105	30	24	21	0	17	0,04
<i>Stylosanthes guianensis</i>	212	31	509	350	95	63	41	12	0	10	0

*PB= Proteína Bruta; EE= Extrato Etéreo; Lig=Lignina; FT= Fenóis Totais; TT= Taninos Totais; TC= Taninos condensados; TCL= Taninos condensados livre; TCP= Taninos condensados aderidos a proteína; TCF= Taninos condensados aderidos a fibra. ^aExpressado em eq-g ácido tânico/kg MS ^bn.d.: não determinado

1.2.3 Bioensaio de produção de gases *in vitro* das leguminosas

As quantificações das produções de gases das plantas taniníferas foram realizadas em bioensaio *in vitro* utilizando-se transdutor de pressão de acordo com metodologia proposta por Theodorou et al. (1994) e adaptada por Mauricio et al. (1999). Em garrafas de vidro de 160 mL foram adicionados 0,5 g de cada planta (tratamento) seca e moída a 1 mm juntamente com 25 mL de inóculo e 50 mL de solução nutritiva. Em metade das garrafas foi adicionado também 0,5 g de polietilenoglicol (PEG) (peso molecular 6000) juntamente com cada leguminosa avaliada. A função do PEG foi neutralizar os efeitos dos TC (MAKKAR, 2003) servindo como controle.

Quatro bovinos Nelore adultos (380 ± 2,95 kg) fistulados no rúmen e mantidos em pastagem foram utilizados como doadores de inóculo. O projeto foi avaliado pelo

comitê Local de Ética em Experimentação Animal – CEUA e recebeu parecer favorável registrado como protocolo número: 2416120916. Após jejum de pernoite, amostras de líquido e sólido do rúmen foram coletados de cada animal. Cada inóculo foi preparado através da mistura de 50% de sólido e 50% de líquido ruminal proveniente de cada bovino doador, sendo homogeneizado em liquidificador e após filtrado em tecidos de algodão (BUENO et al., 2005).

A solução nutritiva foi composta pelas soluções de microminerais ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), macrominerais (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tampão (NH_4CO_3 e NaHCO_3), redutora (cisteína-HCl; NaOH 1M e $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) e indicadora (resazurina).

As medições da produção de gases para cada tratamento foram lidas após 3, 6, 9, 12, 18, 24 horas de incubação. A cada medição, 3 mL dos gases foram coletados e armazenados em tubos de ensaio submetidos a vácuo para posterior mensuração através de cromatografia gasosa. Após 24 h de incubação, amostras do conteúdo ruminal contido em cada garrafa foram coletadas e armazenadas (-20°C) para posterior determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), nitrogênio amoniacal (N-NH_3) e quantificações microbianas através da técnica qPCR. A degradabilidade da matéria seca (DIVMS) foi determinada através da filtragem dos resíduos da fermentação em cadinhos (porosidade 1) forrados com lã de vidro, e posterior secagem em estufa (100°C) para determinação do resíduo. Pela diferença dos resíduos (cinzas) da queima em mufla (550°C) se estimou a degradabilidade da matéria orgânica (DIVMO).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos aleatorizados em arranjo fatorial, com 4 blocos (4 inóculos provenientes dos 4 animais doadores [bovinos Nelore]), sendo 24 tratamentos: 12 forrageiras (dez leguminosas e os controles Tifton e alfafa) com e sem PEG, com 4 repetições (blocos) e duas réplicas dentro de cada bloco.

1.2.4 Ensaio biológico de reatividade dos taninos

A reatividade dos taninos de cada espécie de leguminosa foi estimada através da incubação de curva de equivalência biológica com extrato de acácia (*Acacia mimosa*) conforme metodologia descrita por Bueno et al. (2008). A curva foi feita

usando cinco níveis (100, 200, 300, 400 e 500 mg) do extrato (além de uma dose controle= 0) e 0,5 g de feno de alfafa como substrato.

1.2.5 Determinação do metano

O metano foi analisado por cromatografia gasosa usando uma coluna ShinCarbon micropacked descrito por Sallam et al. (2010). Uma curva de calibração foi gerada usando metano (30% de pureza) como padrão.

1.2.6 Cinética de fermentação ruminal *in vitro* das leguminosas

A cinética de fermentação das leguminosas foi obtido através da técnica semiautomática de produção de gases *in vitro* proposta por Theodorou et al. (1994). Conteúdo ruminal de quatro bovinos Nelore adultos ($380 \pm 2,95$ kg) fistulados no rúmen foi coletado antes da alimentação da manhã. Duas réplicas de cada planta (1 g) combinados ou não com um agente de ligação de taninos (PEG 6000) foram adicionados em frascos de vidro de 160 mL juntamente com 10 mL de inóculo e 90 mL de solução nutritiva. Após 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 34, 48, 60, 72, 96 horas, a pressão foi medida. No final da incubação (96 h), as garrafas foram abertas e amostras do conteúdo ruminal de cada garrafa foram coletadas para a determinação de AGCC e N-NH₃. O material restante foi filtrado em cadinhos para determinar a degradabilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e da matéria orgânica (DIVMO). O fator de partição (PF) foi determinado pela relação entre DIVMO (mg) e a produção de gases (ml), de acordo com Blümmel et al. (1997).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos aleatorizados em arranjo fatorial (12 forrageiras com e sem PEG) e quatro blocos (inóculos). Os dados de produção de gases foram utilizados para determinar a cinética de fermentação com base no modelo de France et al. (1993):

$$y = A \{1 - e^{[-b(t-L) - c(\sqrt{t} - \sqrt{L})]}\}$$
$$\mu = -(b+c)/(2\sqrt{t})$$

onde: y é o volume de gases acumulado no tempo t (mL), A é o potencial de produção de gases (mL), L é a fase lag (h) e b e c são constantes matemáticas do modelo usadas para calcular a taxa fracional de produção de gases (μ , %/h).

1.2.7 Determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH₃)

As concentrações de N-NH₃ nas amostras de líquido ruminal foram determinadas mediante destilação com hidróxido de potássio (KOH) a 50 % e titulação com ácido sulfúrico de concentração de 0,05 N, conforme técnica descrita por Preston (1995).

1.2.8 Determinação do perfil de ácidos graxos de cadeia curta

O perfil dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas amostras de líquido ruminal foram obtidos por cromatografia gasosa de acordo com a metodologia de Erwin et al. (1961) e adaptada por Getachew et al. (2002).

1.2.9 Quantificações microbianas

1.2.9.1 Extração de DNA

Em 1 mL de amostra do conteúdo ruminal coletado nas garrafas do ensaio *in vitro* após 24 horas de incubação foi realizada a extração de DNA através de kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, EUA). Após a extração, a qualidade e a quantidade de DNA extraído nas amostras foram determinadas em espectrofotômetro (DeNovix, Wilmington, EUA).

1.2.9.2 PCR em tempo real

Quantificação absoluta por PCR em tempo real (qPCR) foi realizada para estimar o número total de bactérias, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, arqueias metanogênicas e protozoários nas amostras de conteúdo ruminal. Os pares de *primers* utilizados para as reações de quantificação estão descritos na Tabela 1.2. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi

calculada por seis diluições em duplicata (de 50 a 1,56 ng de DNA) a partir de três amostras selecionadas aleatoriamente. Os valores de CT (do inglês, *cycle thresholds*) foram determinados e plotados contra o logaritmo de cada concentração de DNA para obtenção da curva padrão. Os valores de CT foram submetidos a regressão linear e depois calculado o valor da inclinação das curvas padrões para determinação da eficiência de amplificação através da equação:

$$E = (10^{-1 / \text{slope} - 1}) \times 100$$

Todos os pares de *primers* apresentaram eficiências de amplificação entre 90 e 110%, valores considerados aceitáveis.

Para a quantificação da concentração de DNA bacteriano e protozoário das amostras do rúmen, foi realizada uma curva padrão com diluições de 10 vezes (5×10^2 a 5×10^{-7} ng de DNA) de produto de PCR convencional amplificado com os mesmos *primers* usados para qPCR e purificado de acordo com metodologia descrita por Dhanasekaran et al. (2010). As reações para cada par de *primer* foram realizadas utilizando volume final de 25 µL de reação por poço contendo 50 ng de DNA, 0,3 nM de cada primer, 12,5 µL de DreamTaq® Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Mansfield, EUA) e água ultra-pura MilliQ em poços PCR ProFlex® 3x32-well (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O programa de PCR consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 60°C durante 30 s e extensão a 72°C durante 30 s. As amplificações foram purificadas utilizando o kit comercial QIAquick® PCR Purification (Qiagen, Germantown, EUA) e imediatamente utilizadas para as curvas padrão. Cada curva padrão foi testada três vezes de forma independente e produziu resultados muito similares, o que garantiu a confiabilidade dos padrões.

Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata no aparelho 7500 Fast® Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um volume final de 10 µL de reação por poço contendo 15 ng de DNA, 300 nM de cada primer, 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) e água ultra-pura MilliQ. Um controle negativo foi realizado em cada placa para detectar possíveis contaminantes ou a formação de dímeros de primer. As condições de ciclagem foram desnaturação inicial de 94°C por 10 s seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 s, e 60°C durante 1 min para anelamento e extensão. Imediatamente após a amplificação, uma curva de *melting* foi realizada aumentando a temperatura

a uma velocidade de 0,5°C a cada 30 s de 55 a 95°C. A quantificação de todas as bactérias e protozoários foi realizada na mesma placa para cada amostra. O DNA em ng foi convertido em número de cópias de DNA utilizando os métodos descritos por Godornes et al. (2007) com a seguinte equação:

$$\text{Número de cópias} = \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ (moléculas/mole)} \times \text{massa DNA (ng)}}{\text{Número de pares de bases} \times 660 \text{ Daltons}}$$

1.2.10 Análise Estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os procedimentos estatísticos foram obtidos com auxílio do programa SAS 9.2. O modelo estatístico utilizado para o ensaio *in vitro* com as leguminosas foi: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (ab)_{ij} + b_k + e_{ijk}$, onde: μ = efeito médio geral ijk ; α_i = efeito do nível i do fator leguminosas; β_j = efeito do nível j do fator PEG; b_k = efeito do inóculo K ; e_{ijk} = erro aleatório ijk . O teste de média utilizado para foi o teste Duncan ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 1.2 - Primers utilizados na PCR real time

<i>Espécies alvo</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	<i>pb</i>	<i>Referência</i>
<i>Bactéria total</i>	CGGCAACGAGCGCAACCC (1114)	CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC (1275)	130	Denman & McSweeney (2006)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA (586)	CGCCTGCCCCTGAACTATC (706)	121	Denman & McSweeney (2006)
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG (96)	CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC (220)	132	Denman & McSweeney (2006)
<i>Archaea</i>	AATTGGAKTCCAACGCCGGR (958)	TGGGTCTCGCTCGTTG (1100)	160	Poulsen et al. (2013)
<i>Protozoários</i>	GCTTTCGWTGGTAGTGTATT (316)	CTTGCCCTCYAATCGTWCT (539)	223	Sylvester et al.(2004)

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Reatividade das leguminosas

As espécies *D. paniculatum* e *L. procumbens* foram as que mostraram a maior reatividade e os menores valores de produção de gases proporcional (PGP) dentre das 10 espécies estudadas (Figuras 1.1 e 1.2). Em seguida se destacaram também as espécies *F. macrophylla*, *D. Ovalifolium* e *L. leucocephala*. As leguminosas *C. cajan* e *C. argentea* apresentaram media reatividade. Já os taninos provenientes das espécies *S. guianensis*, *G. sepium* e *M. axilare* resultaram em baixa reatividade.

Figura 1.1 - Produção de gases proporcional expressado sobre a fração do gás produzido em ausência PEG e em presença do PEG (sem efeito dos taninos) após 24h de incubação

Figura 1.2 - Reatividade dos taninos das plantas testadas equivalente ao extrato de acácia

1.3.2 Ensaio de metanogênese

1.3.2.1 Degradabilidade e metano

Dentre as espécies avaliadas, *S. guianensis*, *M. axilare* e *G. sepium* apresentaram os maiores valores de DIVMS e DIVMO (Tabela 1.3). Já as leguminosas *C. argentea* e *L. leucocephala* resultaram em valores de DIVMS e DIVMO intermediários. As espécies tropicais *F. macrophylla*, *D. ovalifolium*, *C. cajan* e as espécies temperadas *D. paniculatum* e *L. procumbens* foram as que apresentaram menores DIVMS e DIVMO. Comportamento semelhante foi observado no grupo com a adição de PEG. Na interação, diferenças na DIVMS e DIVMO com e sem PEG foram observadas somente na espécie *D. ovalifolium*.

Tabela 1.3 - Degradabilidade e produção de metano *in vitro* pelas leguminosas ricas em taninos após 24h de incubação

Plantas	DIVMS ⁽¹⁾ %		DIVMO %		CH ₄ %		CH ₄ (mL /g DIVMS)		CH ₄ (mL /g DIVMO)	
	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG
<i>Cajanus cajan</i>	29,11 ^{aCD*}	34,91 ^{aCD}	33,52 ^{aCDE}	38,01 ^{aCD}	15,22 ^{aAB}	12,43 ^{aA}	44,90 ^{aA}	36,11 ^{aC}	39,24 ^{aA}	33,72 ^{aBC}
<i>Cynodon spp (Tifton 85)</i>	38,67 ^{aB}	35,69 ^{aC}	40,71 ^{aBC}	37,83 ^{aCD}	11,90 ^{aB}	11,15 ^{aA}	34,60 ^{aAB}	42,87 ^{aABC}	34,17 ^{aAB}	42,14 ^{aABC}
<i>Cratylia argentea</i>	33,00 ^{aBC}	34,18 ^{aCD}	36,39 ^{aBCD}	38,03 ^{aCD}	12,34 ^{aB}	13,55 ^{aA}	32,23 ^{aAB}	40,50 ^{aABC}	30,01 ^{aAB}	37,55 ^{aABC}
<i>Desmodium ovalifolium</i>	23,44 ^{bD}	33,31 ^{aCD}	26,64 ^{bEF}	35,60 ^{aDE}	12,80 ^{aAB}	11,75 ^{aA}	36,91 ^{aAB}	34,16 ^{aC}	33,13 ^{aAB}	33,06 ^{aC}
<i>Desmodium paniculatum</i>	20,55 ^{aD}	18,89 ^{aF}	23,31 ^{aF}	20,98 ^{aF}	18,49 ^{aA}	13,89 ^{bA}	32,43 ^{bAB}	59,51 ^{aA}	26,44 ^{bBC}	53,37 ^{aA}
<i>Flemingia macrophylla</i>	23,98 ^{aD}	27,32 ^{aDE}	26,86 ^{aEF}	30,03 ^{aDE}	15,20 ^{aAB}	14,49 ^{aA}	36,91 ^{aAB}	43,09 ^{aABC}	33,03 ^{aAB}	38,97 ^{aABC}
<i>Gliricidia sepium</i>	51,06 ^{aA}	47,97 ^{aAB}	55,75 ^{aA}	51,75 ^{aAB}	14,51 ^{aAB}	11,55 ^{aA}	36,54 ^{aAB}	33,21 ^{aC}	35,45 ^{aAB}	32,55 ^{aC}
<i>Lespedeza procumbens</i>	25,53 ^{aCD}	25,23 ^{aEF}	29,31 ^{aDEF}	28,39 ^{aEF}	15,72 ^{aAB}	14,32 ^{aA}	31,30 ^{bABC}	57,21 ^{aAB}	27,46 ^{bABC}	51,49 ^{aAB}
<i>Leucaena leucocephala</i>	39,68 ^{aB}	43,60 ^{aB}	42,56 ^{aB}	45,95 ^{aBC}	10,77 ^{aB}	13,33 ^{aA}	18,27 ^{aC}	32,60 ^{aC}	17,68 ^{aC}	32,11 ^{aC}
<i>Medicago sativa</i>	55,03 ^{aA}	55,21 ^{aA}	56,73 ^{aA}	56,84 ^{aA}	10,23 ^{aB}	10,06 ^{aA}	29,09 ^{aBC}	27,76 ^{aC}	30,24 ^{aAB}	28,70 ^{aC}
<i>Macrotiloma axillare</i>	55,30 ^{aA}	52,56 ^{aA}	58,29 ^{aA}	53,42 ^{aAB}	11,65 ^{aB}	12,82 ^{aA}	31,32 ^{aABC}	38,81 ^{aBC}	31,19 ^{aAB}	40,26 ^{aABC}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	57,31 ^{aA}	52,62 ^{aA}	60,59 ^{aA}	56,09 ^{aA}	13,69 ^{aAB}	11,68 ^{aA}	36,45 ^{aAB}	34,68 ^{aC}	36,35 ^{aAB}	34,43 ^{aBC}
EPM	2,00		2,19		1,11		3,73		3,81	
P valores	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0260	0,2852	0,0007	0,0014	0,0007	0,0077
P-valores P x PEG	0,3406		0,3130		0,6261		0,0182		0,2353	

⁽¹⁾DIVMS: degradabilidade *in vitro* da MS; DIVMO: degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica; EPM: erro padrão da média; SEM: sem PEG; SEM: sem PEG. PEG: polietilenoglicol. P: plantas
*médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si (teste de Duncan, a 5%); médias seguidas por letras minúsculas distintas nas linhas diferem entre si (teste T, a 5%).

A fermentação *in vitro* de *L. leucocephala* produziu os menores valores de metano por matéria seca e matéria orgânica degradada. As demais espécies taniníferas produziram valores de metano em torno de 30 a 40 ml por g de matéria seca degradada, similares aos valores fornecidos pelos controles Tifton e alfafa. No entanto, com relação a concentração de CH₄ por mL de g de matéria orgânica degradada, apesar de estatisticamente igual aos controles, observou-se uma tendência na redução das emissões de metano para as espécies *D. paniculatum* e *L. procumbens*. Dentre as plantas avaliadas, a fermentação de *C. cajan* resultou nas maiores concentrações de CH₄ por mL/g DIVMS e DIVMO.

Em presença de PEG, a espécie tropical *L. leucocephala* e as espécies temperadas *D. paniculatum* e *L. procumbens* não apresentaram emissões de metano reduzidas. Pelo contrário, *D. paniculatum* e *L. procumbens* foram as forrageiras que produziram valores de metano mais elevados por matéria seca e orgânica degradada. Na interação entre espécies e PEG, os valores de metano foram menores somente para *D. paniculatum*, não sendo significativos para as demais espécies.

1.3.2.2 AGCC, N-NH₃ e quantificações microbianas

De acordo com os resultados, as espécies *S. guianensis*, *M. axillare* e *G. sepium* foram as que resultaram em menores proporções de acetato (Tabela 1.4). Já a fermentação da forrageira *D. ovalifolium* resultou em maiores concentrações de acetato (mmol/g DIVMO). Ao se adicionar PEG, os valores de acetato, propionato e butirato (mmol/g DIVMO) na fermentação de *L. procumbens* e *D. paniculatum* aumentaram significativamente.

Observou-se influência dos TC sobre os ácidos graxos isobutirato (mmol/g DIVMO), isovalerato (mmol/g DIVMO) e valerato. No grupo sem PEG, as degradações de *D. paniculatum*, *F. macrophylla*, *L. procumbens* e *L. leucocephala* resultaram em baixos níveis de isobutirato e valerato. No entanto, no grupo com PEG, estes valores foram bem superiores. O mesmo se observou para os valores de isobutirato para *D. paniculatum*, *F. macrophylla*, *C. cajan*, *L. procumbens* e *L. leucocephala*.

Tabela 1.4 - Concentrações de AGCC e N-NH₃ *in vitro* pelas leguminosas ricas em taninos após 24h de incubação

Plantas	AGCC mmol / g DIVMO													
	Acético		Propiônico		Isobutírico		Butírico		Isovalérico		Valérico		N-NH ₃	
	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG
<i>Cajanus cajan</i>	15,50 ^{ABCD*}	15,36 ^{aDE}	4,28 ^{ABCD}	4,26 ^{aCDE}	0,38 ^{aA}	0,48 ^{aCDE}	1,76 ^{aB}	1,98 ^{aDE}	0,42 ^{bBC}	0,67 ^{aCDE}	0,40 ^{aAB}	0,48 ^{aBCD}	11,82 ^{aBC}	14,37 ^{aA}
<i>Cynodon spp</i>	18,66 ^{aAB}	20,73 ^{aBC}	6,397 ^{aA}	7,53 ^{aA}	0,39 ^{aA}	0,42 ^{aDE}	2,94 ^{aA}	3,30 ^{aA}	0,48 ^{aABC}	0,55 ^{aDE}	0,51 ^{aA}	0,57 ^{aABC}	11,00 ^{aBC}	12,37 ^{aA}
<i>Cratylia argentea</i>	14,83 ^{aBCD}	15,12 ^{aDE}	4,86 ^{aBC}	5,54 ^{aBC}	0,47 ^{aA}	0,51 ^{aBCDE}	1,68 ^{aBC}	1,77 ^{aDEF}	0,67 ^{aA}	0,69 ^{aBCD}	0,37 ^{aB}	0,40 ^{aD}	12,00 ^{aBC}	10,00 ^{aA}
<i>Desmodium ovalifolium</i>	20,58 ^{aA}	16,50 ^{aCDE}	5,71 ^{aAB}	4,71 ^{aCD}	0,44 ^{aA}	0,38 ^{aDE}	1,79 ^{aB}	1,94 ^{aDE}	0,36 ^{aBCD}	0,50 ^{aDE}	0,34 ^{aB}	0,38 ^{aD}	12,75 ^{aBC}	11,12 ^{aA}
<i>Desmodium paniculatum</i>	15,23 ^{bBCD}	28,63 ^{aA}	3,15 ^{bDE}	7,18 ^{aA}	n.d ^b	1,05 ^{aA}	1,01 ^{bDE}	3,12 ^{aAB}	0,14 ^{bE}	1,41 ^{aA}	0,14 ^{bD}	0,65 ^{aA}	12,87 ^{aBC}	17,37 ^{aA}
<i>Flemingia macrophylla</i>	16,11 ^{aABC}	18,99 ^{aBCD}	4,29 ^{ABCD}	5,52 ^{aBC}	0,29 ^{bAB}	0,69 ^{aBC}	1,22 ^{bCDE}	2,11 ^{aCD}	0,26 ^{bCDE}	0,85 ^{aBC}	0,33 ^{bB}	0,59 ^{aAB}	10,25 ^{aC}	11,87 ^{aA}
<i>Gliricidia sepium</i>	10,79 ^{aD}	13,97 ^{aDE}	4,50 ^{aBCD}	5,56 ^{aBC}	0,35 ^{aA}	0,49 ^{aCDE}	1,10 ^{aDE}	1,43 ^{aEF}	0,43 ^{aBC}	0,55 ^{aDE}	0,30 ^{aB}	0,39 ^{aD}	21,87 ^{aA}	17,50 ^{aA}
<i>Lespedeza procumbens</i>	14,08 ^{bBCD}	22,93 ^{aB}	3,95 ^{bCDE}	6,58 ^{aAB}	0,03 ^{bB}	0,74 ^{aB}	0,85 ^{bE}	2,63 ^{aBC}	0,17 ^{bDE}	0,91 ^{aB}	0,15 ^{bCD}	0,51 ^{aABCD}	10,75 ^{aC}	14,00 ^{aA}
<i>Leucaena leucocephala</i>	15,34 ^{aBCD}	14,39 ^{aDE}	5,28 ^{aABC}	4,80 ^{aCD}	0,33 ^{bA}	0,59 ^{aBCD}	1,30 ^{aBCDE}	1,54 ^{aDEF}	0,33 ^{bCDE}	0,63 ^{aCDE}	0,27 ^{bBC}	0,44 ^{aBCD}	11,50 ^{aBC}	14,75 ^{aA}
<i>Medicago sativa</i>	11,14 ^{aCD}	13,42 ^{aE}	2,95 ^{aE}	3,60 ^{aDE}	0,36 ^{aA}	0,44 ^{aDE}	1,49 ^{aBCD}	1,80 ^{aDEF}	0,57 ^{aAB}	0,70 ^{aBCD}	0,30 ^{aB}	0,39 ^{aD}	15,25 ^{aBC}	13,50 ^{aA}
<i>Macrotiloma axillare</i>	11,59 ^{aCD}	12,89 ^{aE}	4,06 ^{aCDE}	4,41 ^{aCDE}	0,36 ^{aA}	0,40 ^{aDE}	1,51 ^{aBCD}	1,67 ^{aDEF}	0,46 ^{aBC}	0,54 ^{aDE}	0,38 ^{aAB}	0,43 ^{aCD}	14,75 ^{aBC}	14,87 ^{aA}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	12,09 ^{aCD}	11,69 ^{aE}	3,18 ^{aDE}	3,09 ^{aE}	0,31 ^{aAB}	0,29 ^{aE}	1,33 ^{aBCDE}	1,25 ^{aF}	0,45 ^{aBC}	0,44 ^{aE}	0,39 ^{aAB}	0,39 ^{aD}	17,75 ^{aAB}	17,12 ^{aA}
EPM ⁽¹⁾	1,13		0,33		0,06		0,13		0,04		0,03		1,53	
P-valores	0,0023	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,2576	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006	<0,0001	0,0002	0,0019	0,0048	0,2093
P-valores P x PEG	0,0001		0,0001		0,0000		0,0000		0,0000		0,0000		0,6749	

⁽¹⁾EPM: erro padrão da média; SEM: sem PEG; PEG: polietilenoglicol; P: plantas. Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na coluna diferem entre si (Duncan, a 5%). Médias seguidas por letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (Teste T, 5%).

A fermentação de *G. sepium* resultou em teores elevados de amônia ruminal dentre as plantas avaliadas. Já as leguminosas *F. macrophylla* e *L. procumbens* apresentaram teores reduzidos de N-NH₃ em relação as demais espécies. Dentro do grupo com PEG, não se observou variações nas concentrações de amônia entre as leguminosas. O mesmo ocorreu para o efeito da interação entre forrageira e PEG.

As análises moleculares mostraram que os TC causaram um aumento no número total de bactérias em relação ao grupo com PEG (Figura 1.3). As espécies *S. guianensis*, *L. leucocephala* e *G. sepium* apresentaram os maiores valores de bactérias totais. No entanto, no grupo com PEG, a média de bactérias na fermentação dessas espécies foi menor. O efeito da interação entre planta e PEG foi observado somente em *L. procumbens*, na qual os valores totais de bactéria aumentaram significativamente com a adição de PEG.

A fermentação *in vitro* de *D. ovalifolium*, *D. paniculatum* e *L. procumbens* resultou em elevadas concentrações de *F. succinogenes* no rúmen (Figura 1.4). Em contrapartida, a inclusão de PEG, reduziu significativamente a população desta bactéria no conteúdo ruminal dessas espécies. Dentro do grupo sem a adição de PEG, observou-se maiores valores de *R. flavefaciens* para *C. cajan*, *M. axillare*, *S. guianensis*, *C. argentea* e *L. leucocephala* e menores para *L. procumbens*, *F. macrophylla*, *D. ovalifolium* e *D. paniculatum* e *G. sepium* (Figura 1.5). Na comparação dentro da interação, apenas *L. procumbens* apresentou valores significativamente inferiores de *R. flavefaciens* com relação a adição de PEG.

As forrageiras *L. procumbens*, *F. macrophylla*, *D. ovalifolium* e *D. paniculatum* foram as espécies que apresentaram menores quantificações de arqueias com relação as demais leguminosas e ao controle Tifton (Figura 1.6). Todavia, no grupo com PEG, essas mesmas plantas não diferiram das demais e nem da gramínea controle. Dentro do desdobramento em PEG, as espécies *L. procumbens* e *D. paniculatum* apresentaram valores de metanogênicas estatisticamente inferiores quando comparadas com a adição de PEG.

As espécies *C. argentea*, *D. paniculatum*, *G. sepium*, *L. procumbens*, *M. axillare* e *S. guianensis* resultaram em menores valores de protozoários, entretanto, em presença de PEG, houve aumento nas quantidades desse microrganismo (Figura 1.7). Por sua vez, nos controles alfafa e Tifton, também se observou valores elevados de protozoários com a adição de PEG.

Figura 1.3 - Efeito dos TC das plantas avaliadas sobre a quantificação de bactérias totais na microbiota de bovinos de corte após 24 h de incubação

Figura 1.4 - Efeito dos TC das plantas avaliadas sobre a quantificação de *F. succinogenes* na microbiota de bovinos de corte após 24 h de incubação

Figura 1.5 -Efeito dos TC das forrageiras avaliadas sobre a quantificação de *R. flavefaciens* no líquido ruminal de bovinos após 24 h de incubação

Figura 1.6 - Efeito dos TC das forrageiras avaliadas sobre a quantificação de arqueias metanogênicas no líquido ruminal de bovinos após 24 h de incubação

Figura 1.7 - Efeito dos TC das plantas avaliadas sobre a quantificação de protozoários na microbiota de bovinos de corte após 24 h de incubação

1.3.3 Ensaio de cinética de fermentação ruminal

1.3.3.1 Degradabilidade, AGCC, FP e N-NH₃

Tanto a gramínea controle Tifton como a alfafa apresentaram altos valores de DIVMS e DIVMO (Tabela 1.5). Das espécies de leguminosas estudadas, *S. guianensis*, *G. sepium* e *M. axillare* resultaram em alta degradabilidade, seguidas por *L. leucocephala* e *C. argentea* com degradabilidade intermediária, e *D. paniculatum*, *F. macrophylla* com baixa degradabilidade; no entanto, a adição de PEG aumentou a degradabilidade das duas últimas espécies.

O fator de partição na fermentação das leguminosas *C. argentea*, *D. paniculatum*, *F. macrophylla* e *L. procumbens* foi significativamente maior no grupo sem PEG. As demais espécies não apresentaram diferenças entre os dois grupos. Os taninos influenciaram as concentrações de N-NH₃ no rúmen, que foram menores no grupo sem PEG. As forrageiras *D. ovalifolium*, *D. paniculatum*, *F. macrophylla*, *L. procumbens* e *L. leucocephala* apresentaram baixas concentrações de amônia ruminal em comparação aos valores apresentados em presença de PEG.

Com relação as concentrações de AGCC, somente na fermentação das espécies *D. paniculatum* e *L. procumbens*, as concentrações de acetato e propionato foram menores quando comparadas as concentrações com adição de PEG (Tabela 1.6). Os taninos de um número maior de espécies estudadas inibiram as concentrações de butirato. Espécies como *D. ovalifolium*, *D. paniculatum*, *F. macrophylla* e *L. procumbens* resultaram em maiores teores de butirato com a adição de PEG. No entanto, o maior efeito dos taninos foi sobre as concentrações total dos AGCC, isobutirato, isovalérico e valérico, onde com exceção apenas dos controles e das espécies *G. sepium*, *M. axillare* e *S. guianensis*, todas as demais leguminosas resultaram em valores muito reduzidos em comparação ao grupo com PEG.

Tabela 1.5 - Degradabilidade, eficiência microbiana e concentrações de N-NH₃ das leguminosas após 96 h de incubação *in vitro*

Plantas	DIVMS ⁽¹⁾ %		DIVMO %		FP (mgMSD/mL)		N-NH ₃ (mg/ 100mL)	
	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG
<i>Cajanus cajan</i>	40,26 ^{aD}	43,51 ^{aDE}	40,61 ^{aD}	43,81 ^{aCDE}	3,09 ^{aBC}	2,84 ^{aC}	22,70 ^{aCD}	27,87 ^{aAB}
<i>Cynodon spp (Tifton 85)</i>	75,12 ^{aA}	73,94 ^{aA}	75,27 ^{aA}	74,76 ^{aA}	2,73 ^{aC}	2,64 ^{aC}	22,12 ^{aCD}	19,37 ^{aD}
<i>Cratylia argentea</i>	55,32 ^{aC}	45,88 ^{bD}	55,44 ^{aC}	50,24 ^{aC}	3,82 ^{aB}	2,87 ^{bC}	25,87 ^{aBCD}	29,87 ^{aAB}
<i>Desmodium ovalifolium</i>	43,21 ^{aD}	47,36 ^{aD}	42,87 ^{aD}	47,11 ^{aCD}	3,11 ^{aBC}	2,81 ^{aC}	12,75 ^{bF}	20,50 ^{aCD}
<i>Desmodium paniculatum</i>	27,84 ^{bF}	33,63 ^{aF}	27,32 ^{bF}	40,95 ^{aDE}	5,50 ^{aA}	2,14 ^{bD}	15,50 ^{bF}	30,25 ^{aAB}
<i>Flemingia macrophylla</i>	29,98 ^{bF}	36,17 ^{aF}	29,83 ^{aF}	35,69 ^{aE}	3,86 ^{aB}	2,73 ^{bC}	17,25 ^{bEF}	27,87 ^{aAB}
<i>Gliricidia sepium</i>	67,58 ^{aB}	63,34 ^{aC}	68,46 ^{aB}	63,73 ^{aB}	3,61 ^{aBC}	3,39 ^{aAB}	30,50 ^{aAB}	34,00 ^{aA}
<i>Lespedeza procumbens</i>	35,22 ^{bE}	40,64 ^{aE}	35,74 ^{aE}	40,88 ^{aDE}	4,74 ^{aA}	2,28 ^{bD}	12,37 ^{bF}	24,75 ^{aBCD}
<i>Leucaena leucocephala</i>	56,72 ^{bC}	63,34 ^{aC}	55,71 ^{bC}	62,78 ^{aB}	3,73 ^{aB}	3,49 ^{aA}	21,25 ^{bDE}	29,12 ^{aAB}
<i>Medicago sativa</i>	69,69 ^{aB}	70,34 ^{aAB}	68,93 ^{aB}	69,68 ^{aAB}	3,27 ^{aBC}	3,32 ^{aAB}	32,12 ^{aA}	26,62 ^{aBC}
<i>Macrotiloma axilare</i>	66,96 ^{aB}	67,13 ^{aBC}	67,17 ^{aB}	67,27 ^{aAB}	3,46 ^{aBC}	3,36 ^{aAB}	25,62 ^{aBCD}	23,37 ^{aBCD}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	69,38 ^{aB}	69,53 ^{aAB}	69,99 ^{aB}	70,24 ^{aAB}	3,22 ^{aBC}	3,18 ^{aB}	26,87 ^{aBC}	27,75 ^{aAB}

⁽¹⁾DIVMS: degradabilidade *in vitro* da matéria seca; DIVMO: degradabilidade *in vitro* da matéria orgânica; SEM: sem PEG; PEG: polietilenoglicol. FP: Fator de partição. *médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si (teste de Duncan, a 5%). Médias seguidas por letras minúsculas nas linhas diferem entre si (teste T, 5%).

Tabela 1.6 – Concentrações de AGCC das leguminosas avaliadas após 96h de incubação *in vitro*

AGCC mmol/g DIVMO												
Plantas	Acético		Propiônico		Isobutírico		Butírico		Isovalérico		Valérico	
	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG
<i>Cajanus cajan</i>	8,42 ^{aAB}	8,43 ^{aBC}	2,35 ^{aABC}	2,33 ^{aBC}	0,19 ^{bABC}	0,26 ^{aCDE}	0,92 ^{aABC}	1,09 ^{aAB}	0,22 ^{bCD}	0,36 ^{aBCDE}	0,22 ^{bAB}	0,28 ^{aB}
<i>Cynodon spp</i>	6,71 ^{aB}	6,96 ^{aC}	2,29 ^{aABC}	2,54 ^{aAB}	0,14 ^{aBCD}	0,14 ^{aF}	1,05 ^{aA}	1,11 ^{aAB}	0,17 ^{aDE}	0,18 ^{aH}	0,18 ^{aBC}	0,19 ^{aDE}
<i>Cratylia argentea</i>	6,74 ^{aB}	7,55 ^{aC}	2,23 ^{aABC}	2,78 ^{aAB}	0,21 ^{aABC}	0,25 ^{aCDE}	0,77 ^{aDE}	0,89 ^{aCDE}	0,31 ^{aB}	0,34 ^{aCDEF}	0,17 ^{aCD}	0,20 ^{aDE}
<i>Desmodium ovalifolium</i>	8,44 ^{aAB}	8,03 ^{aBC}	1,75 ^{aBC}	2,29 ^{aBC}	0,17 ^{aABCD}	0,19 ^{aEF}	0,73 ^{bDEF}	0,94 ^{aBCD}	0,14 ^{bDEF}	0,24 ^{bGH}	0,14 ^{bD}	0,19 ^{aE}
<i>Desmodium paniculatum</i>	8,56 ^{bAB}	10,50 ^{aA}	1,98 ^{aBC}	2,63 ^{aAB}	n.d ^b	0,37 ^{aA}	0,57 ^{bFG}	1,14 ^{aA}	0,08 ^{bF}	0,52 ^{aA}	0,08 ^{bE}	0,23 ^{aBCD}
<i>Flemingia macrophylla</i>	9,45 ^{aA}	9,70 ^{aAB}	2,55 ^{aAB}	2,85 ^{aA}	0,12 ^{bCD}	0,35 ^{aAB}	0,70 ^{bDEF}	1,08 ^{aAB}	0,12 ^{bEF}	0,44 ^{aB}	0,19 ^{bBC}	0,31 ^{aA}
<i>Gliricidia sepium</i>	7,20 ^{aB}	7,52 ^{aC}	2,95 ^{aA}	3,01 ^{aA}	0,26 ^{aA}	0,26 ^{aCDE}	0,73 ^{aDEF}	0,77 ^{aDE}	0,29 ^{aBC}	0,30 ^{aDEFG}	0,20 ^{aBC}	0,21 ^{aCDE}
<i>Lespedeza procumbens</i>	7,48 ^{bAB}	10,48 ^{aA}	1,56 ^{bC}	3,02 ^{aA}	0,06 ^{bD}	0,33 ^{aABC}	0,45 ^{bG}	1,20 ^{aA}	0,08 ^{bF}	0,41 ^{aBC}	0,08 ^{bE}	0,23 ^{aBCDE}
<i>Leucaena leucocephala</i>	7,61 ^{aAB}	6,90 ^{aC}	2,62 ^{aAB}	2,30 ^{aBC}	0,16 ^{bABCD}	0,29 ^{aBCD}	0,64 ^{aEF}	0,74 ^{aE}	0,16 ^{bDE}	0,30 ^{aDEFG}	0,13 ^{bD}	0,21 ^{aCDE}
<i>Medicago sativa</i>	7,52 ^{aAB}	7,15 ^{aC}	1,99 ^{aBC}	1,93 ^{aC}	0,25 ^{aAB}	0,24 ^{aDE}	1,00 ^{aAB}	0,96 ^{aBC}	0,39 ^{aA}	0,37 ^{aBCD}	0,21 ^{aABC}	0,21 ^{aCDE}
<i>Macrotiloma axillare</i>	6,59 ^{aB}	6,77 ^{aC}	2,33 ^{aABC}	2,31 ^{aBC}	0,19 ^{aABC}	0,21 ^{aDEF}	0,86 ^{aBCD}	0,87 ^{aCDE}	0,26 ^{aBC}	0,28 ^{aEFG}	0,22 ^{aAB}	0,22 ^{aBCDE}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	7,45 ^{aAB}	7,41 ^{aC}	1,96 ^{aBC}	1,95 ^{aC}	0,19 ^{aABC}	0,19 ^{aEF}	0,82 ^{aDC}	0,79 ^{aCDE}	0,28 ^{aBC}	0,27 ^{aFG}	0,24 ^{aA}	0,25 ^{aBC}

⁽¹⁾SEM: sem PEG; nd: não detectado; PEG: polietilenoglicol. *médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si (teste de Duncan, a 5%). Médias seguidas por letras minúsculas nas linhas diferem entre si (teste T, 5%).

1.3.3.3 Cinética de degradação

Quanto aos parâmetros de France et al. (1993) (Tabela 1.7), o potencial máximo de produção de gases (“A”) após 96h de fermentação tanto no grupo com e sem PEG foi maior na fermentação da gramínea Tifton, seguida da leguminosa *S. guianensis*, do controle alfafa e de *M. axilare*. Os taninos mais reativos em espécies como *D. paniculatum*, *L. procumbens* e *F. macrophylla* resultaram em baixos valores de “A” no grupo sem PEG. No tratamento com PEG, a neutralização dos taninos, resultou em maiores valores de “A” em todas as leguminosas estudadas, com exceção para *G. sepium*. No entanto, com relação ao tempo de colonização (“L”, também chamado de lag time), somente para *L. procumbens*, este foi significativamente superior ao tratamento com a adição de PEG. Nas espécies *D. ovalifolium*, *F. macrophylla* e *L. procumbens*, o tempo para atingir a metade do valor assintótico (“ $T_{1/2}$ ”) no tratamento sem a neutralização dos taninos, foi significativamente superior em relação ao com PEG.

As curvas de produção de gases acumulada após 96 h de fermentação das leguminosas estão ilustradas na Figura 1.8. Observa-se que dentre as plantas avaliadas, *G. sepium* e *S. guianensis* demonstraram fermentação semelhante nos tratamentos com e sem PEG. As espécies *C. argentea* e *M. axilare* apresentaram um discreto aumento na fermentação com a adição de PEG. Foram observadas maiores taxas de produção de gases para *C. cajan*, *D. ovalifolium* e *L. leucocephala* em presença de PEG. No entanto, a maior influência dos taninos ocorreu nas espécies *D. paniculatum*, *F. macrophylla* e *L. procumbens*, onde a fermentação destas últimas resultaram nas menores taxas de produção de gases no tratamento sem adição de PEG.

As maiores taxas de produção de gases (“ μ ”) foram observadas em *G. sepium* e *S. guianensis*, e as mais baixas em *F. macrophylla* e *D. ovalifolium* (Figura 1.9). A adição de PEG, resultou em taxas de produção de gases superiores para *L. procumbens*, *F. macrophylla*, *D. ovalifolium*, *D. paniculatum* e *L. leucocephala*.

Tabela 1.7 - Potencial de produção de gases (A), fase de latência (L), tempo para

Plantas	A (mL)		L (h/min)		T _{1/2} (h)	
	SEM	PEG	SEM	PEG	SEM	PEG
<i>Cajanus cajan</i>	122,87 ^{bF}	138,50 ^{aF}	3,66 ^{aB}	3,30 ^{aA}	29,20 ^{aCD}	23,10 ^{aD}
<i>Cynodon spp</i>	254,52 ^{bA}	258,82 ^{aA}	4,10 ^{aAB}	4,00 ^{aA}	29,56 ^{aCD}	29,81 ^{aA}
<i>Cratylia argentea</i>	139,45 ^{bE}	146,15 ^{aF}	3,55 ^{aB}	4,74 ^{aA}	27,17 ^{aDE}	26,30 ^{aBC}
<i>Desmodium ovalifolium</i>	143,12 ^{bE}	155,60 ^{aE}	4,84 ^{aAB}	4,18 ^{aA}	41,45 ^{aAB}	27,16 ^{bB}
<i>Desmodium paniculatum</i>	46,43 ^{bH}	145,40 ^{aF}	4,47 ^{aAB}	4,53 ^{aA}	24,53 ^{aDEF}	26,37 ^{aBC}
<i>Flemingia macrophylla</i>	81,99 ^{bG}	123,27 ^{aG}	3,87 ^{aB}	4,25 ^{aA}	44,92 ^{aA}	29,42 ^{bA}
<i>Gliricidia sepium</i>	165,92 ^{aD}	166,42 ^{aD}	3,92 ^{aB}	4,47 ^{aA}	22,25 ^{aEF}	22,90 ^{aD}
<i>Lespedeza procumbens</i>	75,60 ^{bG}	163,85 ^{aD}	6,21 ^{bA}	3,86 ^{aA}	39,42 ^{aB}	26,62 ^{bBC}
<i>Leucaena leucocephala</i>	147,32 ^{bE}	165,47 ^{aD}	4,72 ^{aAB}	4,25 ^{aA}	33,49 ^{aC}	25,11 ^{aC}
<i>Medicago sativa</i>	188,01 ^{aBC}	187,15 ^{bC}	3,04 ^{aB}	3,41 ^{aA}	20,85 ^{aF}	21,34 ^{aE}
<i>Macrotiloma axillare</i>	175,25 ^{bCD}	180,95 ^{aC}	3,53 ^{aB}	3,86 ^{aA}	23,39 ^{aEF}	23,61 ^{aD}
<i>Stylosanthes guianensis</i>	192,92 ^{bB}	197,45 ^{aB}	3,38 ^{aB}	3,61 ^{aA}	20,21 ^{aF}	20,72 ^{aE}
P-valor	<0,0001	<0,0001	0,0284	<0,0001	<0,0001	<0,0001

atingir a metade do valor Assintótico ($T_{1/2}$)

⁽¹⁾ SEM: sem PEG; PEG: polietilenoglicol. *médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas colunas diferem entre si (teste de Duncan, a 5%). France (1993): $p = a + b (1 - \exp^{-ct})$, onde p = produção de gas (ml), em tempo t , a e b = constantes do modelo; c = taxa de produção de gases (h^{-1}); $a+b$ = potencial de produção de gases (ml); and L = lag time (h).

Figura 1.8 - Produção cumulativa de gases das leguminosas estudadas ao final de 96h

Figura 1.9 - Taxa de produção de gases da leguminosas estudadas ao final de 96h

1.4 DISCUSSÃO

1.4.1 Bioensaio de metanogênese

Apesar de já existirem algumas pesquisas utilizando leguminosas taniníferas na nutrição de ruminantes, é importante destacarmos que nem todos os tipos de taninos produzem efeitos nutricionais benéficos. Dentre as espécies avaliadas no estudo, as temperadas apresentaram reatividade superior as tropicais. Outro aspecto relevante observado foi que espécies tropicais como *S. guianensis* e *G. sepium* praticamente não demonstraram efeito biológico. Devido à maior diversidade de patógenos encontrada nos biomas tropicais, tais como uma maior riqueza de insetos e microrganismos, esperávamos maior bioatividade para os taninos presentes nas plantas tropicais. No entanto, sabemos que tanto fatores bióticos como os abióticos influenciam a composição e concentração destes compostos químicos. Em condições adversas de temperatura, incidência de luz, escassez hídrica e de nutrientes, a produção dos taninos em alguns tipos de plantas é estimulada (BLACKMON et al., 2016). A tamanha diversidade dos tipos de TC e a grande variação entre as espécies de plantas como também em uma mesma espécie (NAUMANN et al., 2014), são justamente o grande desafio para que pesquisas na área consigam chegar a uma resposta biológica eficaz.

O efeito biológico dos taninos sobre os microrganismos ruminais normalmente é associado à quantidade de taninos condensados que as plantas apresentam, já que são estes, os compostos que provocam a atividade antimicrobiana. No presente estudo, a espécie com maior concentração de TC pelas análises químicas foi *F. macrophylla* (20,32%), seguida das espécies *D. paniculatum* e *L. procumbens* (18,70 e 14,32%). Apesar dos altos valores de taninos condensados encontrados em *F. macrophylla*, esta forrageira não apresentou a maior reatividade dentre as demais plantas. Outro fato interessante ocorreu na avaliação das espécies *G. sepium* e *C. cajan*, que apesar das concentrações de TC de 7,85 e 8,42%, semelhantes às concentrações observadas nas espécies *L. leucocephala* e *D. ovalifolium*, foram plantas com baixa reatividade. Nosso estudo demonstra, que em algumas espécies de plantas, a bioatividade dos TC não está associada à análise química, estando estes muito mais associados à composição do

que à concentração dos mesmos. Sendo, portanto, fundamental a mensuração da reatividade dos taninos condensados nesses tipos de estudo. Em corroboração ao que foi observado, diferenças entre reatividade e concentração de taninos também foram relatados por Bueno et al. (2008).

Ainda neste ensaio, verificou-se uma relação próxima entre bioatividade e concentração de fenóis totais; onde as plantas com maior reatividade também foram as espécies que possuíram altas quantidades de fenóis totais. Dentre as leguminosas avaliadas, as duas forrageiras tropicais com os maiores valores de fenóis (*D. ovalifolium* e *L. leucocephala*) também foram as leguminosas tropicais com maiores reatividade.

Com relação às porcentagens de taninos condensados aderidos, as análises químicas, mostraram altas concentrações de TC aderidos à proteína nas forrageiras *F. macrophylla* e *D. paniculatum*. Já os teores de TC aderidos à fibra foram baixos em todas as espécies estudadas. No entanto, os dados sugerem que tanto os TC livres quanto os aderidos à proteína não foram associados à reatividade das leguminosas avaliadas. Em concordância, Naumann et al. (2013) relataram que pesos moleculares de TC livres não são indicativos de taninos com atividade biológica.

As espécies que apresentaram baixa degradabilidade *in vitro* (*F. macrophylla*, *D. ovalifolium*, *D. paniculatum* e *L. procumbens*) não necessariamente foram as mesmas que alcançaram concentrações mais baixas de acetato (mmol/g MOD); pelo contrário, as espécies com maiores taxas de degradação como *S. guianensis*, *M. axillare* e *G. sepium* foram as que resultaram em menores proporções de acetato. Adicionalmente, com exceção de *L. leucocephala*, as leguminosas com menores degradabilidade também foram as que apresentaram os TC mais reativos e vice-versa. Em contrapartida, com exceção para *D. paniculatum*, a adição de PEG não promoveu aumento nos valores de degradabilidade *in vitro* nestas espécies, enquanto que os valores de acetato foram aumentados. Tais achados, indicam que os taninos provavelmente não foram os responsáveis pela baixa degradabilidade nas plantas temperadas, justificado pela ausência de uma superior degradabilidade em presença do PEG. Provavelmente as diferenças na degradabilidade e no percentual de acetato observada entre as plantas, estejam mais relacionadas aos componentes de parede celular e ligações covalentes com a lignina. Uma alta degradabilidade na fermentação *in vitro* de *L. leucocephala* também foi observada

por Santos et al. (2017). Já as elevações nas concentrações de acetato nas plantas temperadas em presença de PEG podem estar associadas aos maiores valores de ácidos graxos de cadeia ramificada (AGCR) observados nestas espécies e essenciais para a síntese de proteína de bactérias celulolíticas. Piva et al.(1988), ao estudarem o efeito da suplementação dos isoácidos sobre a fermentação ruminal *in vitro*, relataram um aumento nos níveis de acetato com o aumento dos níveis de isoácidos. Liu et al. (2016) também observaram aumento nas concentrações de acetato com a adição de isovalerato em dietas de bezerro.

Em concordância aos achados acima, nosso estudo mostrou grande redução dos TC das plantas mais reativas sobre os valores de isobutirato (mmol/g DIVMOD), isovalerato (mmol/g DIVMOD) e valerato (mmol/ g DIVMOD). No entanto, no grupo com PEG, estes valores foram significativamente superior. Como sabemos, o principal efeito biológico dos TC no rúmen se deve a capacidade de formar complexos com outras macromoléculas, principalmente com a proteína, impedindo a sua degradação pela microbiota. Os isoácidos por serem provenientes da desaminação dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina por determinadas bactérias no rúmen estão estritamente relacionados ao metabolismo da proteína ruminal, e consequentemente uma proteção na desaminação da proteína pelos TC justificaria tal efeito. Reduções nas concentrações de isoácidos pelos taninos também foram descritas em estudo realizado por Bhatta et al. (2009).

Com relação ao potencial de redução das emissões de metano, observou-se maior supressão em *L. leucocephala*. A espécie apresentou os menores valores de metano por matéria seca e matéria orgânica degradada. Altas reduções nas emissões metano e superiores degradabilidade *in vitro* em *L. leucocephala* também foram observados por Soltan et al. (2012) e Santos et al. (2017), respectivamente. Apesar de estatisticamente *L. leucocephala* não ter superado a leguminosa *L. procumbens* na redução da emissão de metano, os valores superiores de DIVMS e DIVMO demonstram uma maior eficiência. Estas mesmas espécies não apresentaram valores de metano reduzidos no grupo com PEG. A bioatividade dos TC presente nas espécies *D. paniculatum*, *L. procumbens* e *L. leucocephala* foi confirmada com os valores superiores de metano em presença de PEG. O efeito mitigador dos TC sobre a produção de metano *in vitro* vem sendo continuamente relatado em ensaios na literatura (BHATTA et al., 2009; SOLTAN et al., 2012; BHATTA et al., 2013; BUENO et al., 2015; SANTOS et al., 2017).

Em discrepância as observações relatadas por Bhatta et al. (2009) e Bhatta et al. (2013), a adição de PEG, não resultou em maiores níveis de N-NH₃. No entanto, devido a habilidade dos taninos em inibir a degradação da proteína, esperava-se uma redução nos níveis de N-NH₃ nos tratamentos com taninos.

Os TC mais reativos foram responsáveis por um aumento no número total de bactérias no rúmen. Para tal fato, a explicação mais plausível, é que provavelmente, algumas espécies de bactérias, tenham sido beneficiadas pela supressão de outros microrganismos ocasionada pela atividade antimicrobiana dos TC; uma vez que, na competição do ecossistema ruminal, o prejuízo de determinadas espécies remete o benefício de outras. O acréscimo no número total de bactérias com a adição de taninos também foi observado por Bhatta et al. (2009).

As quantificações moleculares revelaram uma forte relação dos TC com a bactéria *F. succinogenes*. Os TC são conhecidos por provocarem efeito direto sobre espécies de bactérias celulolíticas, sendo assim, dentro do grupo sem PEG, esperava-se uma diminuição no número dessas bactérias, todavia observou-se o inverso; os taninos aumentaram significativamente as concentrações desse microrganismo no rúmen. Com exceção para *L. procumbens*, as leguminosas com maior reatividade foram as que apresentaram os maiores valores para esta bactéria. Dentre as alterações dos TC sobre as bactérias celulolíticas, a literatura menciona prováveis efeitos deletérios diretos e indiretos (MIN et al., 2005; WANG et al., 2009; PATRA & SAXENA, 2011). Entretanto, no presente estudo, os TC mais bioativos favoreceram a população de *F. succinogens*. Em corroboração a esta observação, ensaios realizados por Chanthakhoun et al. (2011) e Min et al. (2012) verificaram maiores valores de bactérias celulolíticas, incluindo a espécie *F. succinogenes*, para os tratamentos com TC.

Embora a média geral de *R. flavefaciens* tenha sido maior para o grupo com PEG, somente os TC de *L. procumbens* reduziram significativamente a população de *R. flavefaciens*. Efeitos redutores de TC de algumas plantas sobre *R. flavefaciens* já foram previamente descritos na literatura (GUIMARÃES-BEELLEN et al., 2006), assim como, a ausência de efeito também já foi relatada (RODRIGUÉZ et al., 2011). A discrepância entre os resultados descritos na literatura se deve às inúmeras possibilidades de variações nos monômeros de TC entre as espécies de plantas.

As análises de qPCR mostraram que os TC das espécies mais reativas *D. paniculatum* e *L. procumbens* diminuíram significativamente a população de arqueias no conteúdo ruminal de bovinos de corte. Normalmente, a redução de metano observada em estudos pelos taninos é atribuída a menor degradabilidade da fibra e ou a diminuição no consumo pelo animal, em casos de experimentos *in vivo*. No entanto, neste ensaio *in vitro*, uma supressão direta dos TC sobre a população de arqueias é claramente notada. A inibição na quantidade de arqueias metanogênicas pelos taninos já foi descrita em alguns estudos (TAVENDALE et al., 2005; BHATTA et al., 2009; LIU et al., 2011).

A população de protozoários também foi afetada pelos taninos das plantas avaliadas. Observou-se que no grupo com TC+PEG, a média geral na quantidade de protozoários aumentou em comparação ao grupo sem PEG. Curiosamente, os TC de espécies pouco reativas como *C. argentea*, *G. sepium*, *M. axillare* e *S. guianensis* reduziram a população de protozoários; enquanto que TC mais reativos observado nas espécies *L. leucocephala*, *D. ovalifolium* e *F. macrophylla* não afetaram a concentração desses microrganismos. Em corroboração ao presente estudo, efeitos dos taninos sobre a população de protozoários foram descritos em ensaio *in vitro* realizado por Bhatta et al. (2009). O mesmo efeito também foi verificado em outro estudo *in vitro* testando 21 espécies de plantas taniníferas (BHATTA et al., 2013).

Conforme relatado anteriormente, a espécie tropical *L. leucocephala*, juntamente com as leguminosas temperadas, reduziu eficientemente as emissões de metano. No entanto, as análises de PCR em tempo real mostraram que a mesma não diminuiu a população de arqueias e nem a de protozoários; como também, os valores de degradabilidade não foram influenciados pela adição de PEG. Desta forma, a atribuição dos menores valores de metano a qualidade nutricional desta espécie, não justificaria o aumento de CH₄ em presença do PEG. Diante dessas observações, a supressão de metano pelos taninos dessa forrageira, parece estar relacionado ao aumento de *F. succinogenes* e à diminuição na produção de isoácidos. Todavia, devido à importância dos ácidos graxos de cadeia ramificada para a síntese de proteína microbiana nas espécies celulolíticas, esperávamos que o aumento do último resultasse na maior proporção do outro. Os resultados inovadores observados no estudo através das técnicas moleculares indicam que

muitos dos efeitos antimicrobianos dos TC sobre o ecossistema ruminal ainda precisam ser elucidados.

1.4.2 Ensaio de cinética de degradação ruminal

Analisando os dados de cinética de degradação ruminal das leguminosas estudadas, nota-se que os taninos das espécies *L. procumbens*, *D. paniculatum*, *L. leucocephala*, *D. ovalifolium* e *F. macrophylla* foram mais reativos que das demais plantas estudadas. Essas forrageiras apresentaram comportamento cinético diferenciado no tratamento contendo PEG, confirmando a influência dos TC no processo fermentativo das mesmas. Já nas espécies *G. sepium*, *S. guianensis* e *M. axillare*, os perfis de produção de gases foram similares nos tratamentos com e sem PEG, evidenciando uma ausência de reatividade dos taninos nessas plantas.

A leguminosa *D. paniculatum* apresentou o maior efeito sobre a produção acumulada de gases, no entanto, não foi quimicamente a espécie com maior concentração de TC. O fato de alguns taninos serem mais reativos que outros, se deve a composição das unidades de monômeros em sua estrutura química, e seu efeito biológico independe da concentração química na forrageira (BUENO et al., 2008), ressaltando a importância dos ensaios que predizem a bioatividade dos principais compostos fenólicos presentes nas plantas.

Como era esperado, as espécies com os TC menos reativos (*G. sepium*, *S. guianensis* e *M. axillare*) apresentaram os maiores valores de DIVMS e DIVMO, e as espécies com os TC mais reativos (*D. paniculatum*, *L. procumbens* e *F. macrophylla*), os menores valores. O aumento significativo nos valores de DIVMS e DIVMO com a adição de PEG evidencia o efeito inibitório dos taninos sobre a degradação ruminal *in vitro* do substrato. Resultados semelhantes foram previamente descritos na literatura (BABA et al., 2002; GEMEDA; HASSEN, 2015).

No presente estudo, nota-se que os taninos mais reativos resultaram em altos valores de FP (mg MOD/ml), sendo que em presença de PEG o mesmo não ocorreu, demonstrando a ocorrência de maior produção de gases e menor degradação. Na literatura, resultados semelhantes foram relatados por Bueno et al. (2015), onde em ensaio *in vitro* esses autores também verificaram altos valores de FP na incubação dos substratos com taninos. E conforme relatado por estes autores, diferentemente da degradabilidade verdadeira, a degradabilidade aparente,

quando utilizada, devido à perda de material solúvel por lavagem, pode resultar em valores de FP imprecisos. Portanto, partimos da hipótese de que, os altos valores de FP, são consequência da perda de material solúvel do substrato por lavagem, na qual, a degradação foi inibida pela presença dos taninos no meio. Tal efeito, portanto, nos leva a afirmar que o FP não é um parâmetro adequado para medir a eficiência microbiana em ensaios com taninos, levando a estimativas incorretas.

Como consequência da complexação dos TC com proteínas, as incubações dentro do grupo sem PEG resultaram em menores concentrações de amônia ruminal. Valores de amônia significativamente inferiores na fermentação de *D. ovalifolium*, *D. paniculatum*, *L. procumbens*, *F. macrophylla* e *L. leucocephala* se devem provavelmente à inibição da desaminase pela microbiota ruminal. Tanto a redução dos isoácidos (BHATTA et al., 2009), como a diminuição nas concentrações de N-NH₃ pelos taninos já foram previamente relatados na literatura em ensaios *in vitro* (KHIAOSA-ARD et al., 2009; BHATTA et al., 2013). Além dos efeitos *in vitro*, Fagundes et al. (dados não publicados) observaram significativa redução nos valores de amônia ruminal em cabras consumindo *F. macrophylla* em comparação aos animais com a inclusão de PEG na dieta.

Embora o efeito mais pronunciado dos TC em resposta a adição de PEG tenha sido sobre os isoácidos, algumas espécies (*Desmodium ovalifolium*, *Desmodium paniculatum*, *F. macrophylla* e *L. procumbens*) em ausência de PEG reduziram os teores de butirato e duas dentre essas (*Desmodium paniculatum* e *L. procumbens*) reduziram significativamente também as concentração de acetato. Tal observação, reflete o efeito dos tipos de TC presente nestas plantas sobre a fermentação ruminal. Os taninos são capazes de alterar o perfil da microbiota ruminal, e dependendo de sua estrutura química, peso molecular e tipo de ligação formada com outras macromoléculas, pode agir de forma seletiva sobre algumas populações de microrganismos, modificando assim, as rotas metabólicas dos AGCC produzidos (PATRA; SAXENA, 2011). Alterações no perfil de AGCC no rúmen em ensaio com taninos são frequentemente relatadas na literatura (FRUTOS et al., 2004; CALABRÒ et al., 2012; BHATTA et al., 2013; BUENO et al., 2015).

Conforme o esperado, o potencial da produção de gases (“A”) observado na gramínea Tifton-85, devido a sua maior concentração de fibra, foi superior ao das leguminosas avaliadas. Juntamente com a espécie controle alfafa, as plantas com os TC menos reativos (*S. guianensis*, *M. axillare* e *G. sepium*) apresentaram valores

de ("A") mais elevados. Em presença do PEG, o potencial de produção de gases ("A") foi maior em quase todas as leguminosas, evidenciando a inibição da degradação ruminal pelos TC. Os baixos valores de ("A") em *D. paniculatum*, *L. procumbens* e *F. macrophylla* em presença dos taninos refletem uma alta bioatividade destes.

Ainda com relação ao modelo matemático usado para ajuste dos dados de cinética fermentativa, o tempo para atingir a metade do valor assintótico (" $T_{1/2}$ ") foi diminuído pelos TC em *D. ovalifolium*, *L. procumbens* e *F. macrophylla*, e somente na fermentação de *L. procumbens*, os TC ocasionaram maior tempo de colonização (" L "); possivelmente, este último, possa estar atribuído, a interferência dos taninos sobre a fermentação microbiana de partículas solúveis e prontamente disponíveis no rúmen. Segundo Baba et al. (2002), o maior aumento de produção de gases acompanhado de menor acréscimo na degradabilidade em presença de PEG, reflete o aumento na degradação tanto de frações solúveis como insolúveis.

O comportamento da PG e a taxa de fermentação durante as 96 h foram influenciados pelos taninos. *D. paniculatum*, *F. macrophylla* e *L. procumbens* foram as plantas com maiores reduções na curva de produção de gases nas incubações sem PEG. Os maiores valores de PG em presença de PEG, descartam possíveis interferências nutricionais e confirmam que a fermentação dessas espécies foi negativamente influenciada por estes compostos bioativos.

A inativação dos TC com a adição de PEG também resultou em maiores taxas de fermentação (" μ "). Entre as plantas avaliadas, as tropicais *D. ovalifolium* e *F. macrophylla* apresentaram menores taxas de (" μ "). Resultados semelhantes foram obtidos por Kamalac et al. (2005) e Calabrò et al. (2012), onde incubações com PEG também resultaram em produção de gases superiores na fermentação das plantas taniníferas avaliadas.

1.5 CONCLUSÕES

Maiores valores de isobutirato, isovalerato e valerato com a adição de PEG, indicam que os TC afetam a concentração desses isoácidos. Os taninos mais reativos causaram aumento no número total de bactérias no rúmen, efeito deletério

na população de *R. flavefaciens*, e, contrário a hipótese na literatura, efeito benévolo sobre a população de *F. succinogenes*. Os estudos microbiológicos, confirmaram ainda, a inibição direta dos TC sobre a população de arqueias metanogênicas. Das plantas taniníferas avaliadas, *L. procumbens*, *D. paniculatum*, *L. leucocephala*, *D. ovalifolium* e *F. macrophylla*, foram as espécies, que apresentaram fonte de taninos com efetiva capacidade de modular a fermentação ruminal. Na produção de metano, *L. leucocephala*, *D. paniculatum* e *L. procumbens* foram as forrageiras com maior redução sobre a metanogênese, revelando-se promissora alternativa ao uso de ionóforos para reduções nas emissões de metano em bovinos. No entanto, a leguminosa *L. leucocephala* por resultar em maiores porcentagens de degradabilidade *in vitro* se destacou entre as demais.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed., 4 rev., 1998. 2v.

CARVALHO, T.B.; DE ZEN, S. A cadeia de pecuária de corte no Brasil: evolução e tendências. **Revista IPecege**, v., p.85-99, 2017.

BHATTA, R.; BARUAH, L.; SARAVANAN, M.; SURESH, K. P.; SAMPATH, K. T. Effect of medicinal and aromatic plants on rumen fermentation, protozoa population and methanogenesis *in vitro*. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v.97, p.446-456, 2013.

BHATTA, R.; UYENO, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; YABUMOTO, Y.; NONAKA, I.; ENISHI, O.; KURIHARA, M. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5512-5522, 2009.

BLACKMON, T.K.; Muir, J.P.; WITTIE, R.D.; KATTES, D.H.; LAMBERT, B.D. Legume nitrogen and phenolic concentration comparisons between simulated and insect herbivory. **Journal of Plant Interaction**, v.11, p.61-66, 2016.

Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia. Relatórios de referência: **Emissões de metano pela pecuária**. In: Primeiro inventário brasileiro de emissões antrópicas de gases de efeito estufa, Brasília: MCT. 2006.77 pp.

BUENO, I.C.S.; VITTI, D.M.S.S.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 153-170, 2008.

BUENO, I.C.S.; BRANDI, R.A.; FRANZOLIN, R.; FAGUNDES, G.M.; BENETEL, G.; ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; MUIR, J. P. Comparative *in vitro* methane production and antimethanogenic effect of tannins in five ruminant species. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p.1-9, 2015.

CHANTHAKHOUN, V.; WANAPAT, M.; WACHIRAPAKORN, C.; WANAPAT, S. Effect of legume (*Phaseolus calcaratus*) hay supplementation on rumen microorganisms, fermentation and nutrient digestibility in swamp buffalo. **Livestock Science**, v.140, p.17-23, 2011.

DENMAN, S. E.; MCSWEENEY, C. S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p. 572-582, 2006.

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY, T.M.; KENNETH, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. **Journal of Immunology Methods**. v.354, p.34–39, 2010.

EPA. Inventory of U.S. greenhouse gas emissions and sinks: 1990-2008. U.S. EPA: Washington DC, 2010, capítulo 6 p.6.1-6.7

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p.1768-1771, 1961.

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

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **Journal of Agricultural Science**, v.139, p.341-352, 2002.

GODORNES, C.; LEADER, B.T.; MOLINI, B.J.; CENTURION-LARA, A.; LUKEHART, S.A. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. **Cytokine**. V.38, p.1, 2007.

GUIMARÃES-BEELLEN, P.M; BERCHIELLE, T.T.; BUDDINGTON, R.; BEELEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.910-917, 2006.

JAYANEGARA, A.; TOGTOKHBAYAR, N.; MAKKAR, H. P., BECKER, K. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 150, p. 230-237, 2009.

KAMALAK, A. D. E. M.; CANBOLAT, O.; SAHIN, M.; GURBUZ, Y.; OZKOSE, E.; OZKAN, C. O. The effect of polyethylene glycol (PEG 8000) supplementation on *in vitro* gas production kinetics of leaves from tannin containing trees. **South African Journal of Animal Science**, v.35, p.229-237, 2005.

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

LIU, H.; VADDELLA, V.; ZHOU, D. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emission, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. ***Journal of Dairy Science***, v.94, p.6069-6077, 2011.

LIU, Q.; WANG, C.; ZHANG, Y.; PEI, C.; ZHANG, S.; WANG, Y.; ZHANG, Z.; YANG, W.; WANG, H.; GUO, G.; HUO, W. Effects of isovalerate supplementation on growth performance and ruminal fermentation in pre-and post-weaning dairy calves. ***The Journal of Agricultural Science***, v.154, p.1499-1508, 2016.

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

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 Science and Food Agriculture***, v. 61, p.161-165, 1993.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. ***Animal Feed Science and Technology***, v.79, p.321-330, 1999.

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

MIN, B. R.; ATTWOOD, G. T.; MCNABB, W. C.; MOLAN, A. L.; BARRY, T. N. The effect of condensed tannins on the proteolytic activities and growth of rumen bacteria. **Animal Feed Science and Technology**, v.121, 45-58, 2005.

MIN, B. R.; PINCHAK, W. E.; HERNANDEZ, K.; HERNANDEZ, C.; HUME, M. E.; VALENCIA, E.; FULFORD, J. D. Effects of plant tannin supplementation on animal responses and in vivo ruminal bacterial populations associated with bloat in heifers grazing wheat forage. **The Professional Animal Scientist**, v. 28, p.464-472, 2012.

NAUMANN, H. D.; TEDESCHI, L. O.; MUIR, J. P.; LAMBERT, B. D.; KOTHMANN, M. M. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane production *in vitro*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.50, p.154-162, 2013.

NAUMANN, H.D.; ARMSTRONG, S.A.; LAMBERT, B.D.; MUIR, J.P.; TEDESCHI, L.O.; KOTHMANN, M.M. Effect of molecular weight and concentration of legume condensed tannins on *in vitro* larval migration inhibition of *Haemonchus contortus*. **Journal of Veterinary Parasitology**, v.199, p.93-98, 2014.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.24-37, 2011.

PIVA, G; MASOERO, F.; CURTO, O. The effect of isoacids on ruminal fermentation: *in vitro* trials. **Reproduction Nutrition Development**, v. 28, p.163–164, 1988.

POULSEN, M.; SCHWAB, C.; JENSEN, B. B.; ENGBERG, R. M.; SPANG, A.; CANIBE, N.; HØJBERG, O.; MILINOVICH, G.; FRAGNER, L.; SCHLEPER, C.; WECKWERTH, W.; LUND, P.; SCHRAMM, A.; URICH, T. Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. **Nature Communications**, v. 4, p.1428, 2013.

PRESTON, T.R. Biological and chemical analytical methods. In Preston, T.R. **Tropical Animal Feeding a Manual for Research Workers**. Rome: FAO, 1995, p. 191-264.

RODRÍGUEZ, R.; BRITOS, A.; RODRÍGUEZ-ROMERO, N.; FONDEVILA, M. Effect of plant extracts from several tanniferous browse legumes on in vitro microbial fermentation of the tropical grass *Pennisetum purpureum*. **Animal Feed Science and Technology**, v.168, p.188-195, 2011.

SALLAM, S.; BUENO, I.C.S.; NASSER, M.E.; ABDALLA, A.L. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission *in vitro*. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, p.299-303, 2010.

SANTOS, K. C.; MAGALHÃES, A. L. R.; SILVA, D. K. A.; ARAÚJO, G. G. L.; FAGUNDES, G. M.; YBARRA, N. G.; ABDALLA, A. L. Nutritional potential of forage species found in Brazilian Semiarid region. **Livestock Science**, v.195, p.118-124, 2017.

SAS INSTITUTE. 2000. The SAS system for windows. Release 8.01. Cary.
SOLTAN, Y. A.; MORSY, A. S.; SALLAM, S. M. A.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A. L. Comparative in vitro evaluation of forage legumes (prosopis, acacia, atriplex, and leucaena) on ruminal fermentation and methanogenesis. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.21, 2012.

SYLVESTER, J. T.; KARNATI, S. K.; YU, Z.; MORRISON, M.; FIRKINS, J. L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **The Journal of Nutrition**, v.134, p.3378-3384, 2004.

TAVENDALE, M.H.; MEAGHER, L.P.; PACHECO, D.; WALKER, N.; ATTWOOD, G.T.; SIVAKUMARAN, S. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Animal Feed Science and Techonology**, v.123–124, pp. 403–419, 2005.

TEDESCHI, L.O.; RAMÍREZ-RESTREPO, C.A.; MUIR, J.P. Developing a conceptual model of possible benefits of condensed tannins for ruminant production. **Animal**, v.8, p.1095-1105, 2014.

TERRIL, T.H.; ROWAN, A.M.; DOUGLAS, G.B.; BARRY, T.N. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v.58, p.321-329, 1992.

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 of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

WANG, Y.; ALEXANDER, T. W.; MCALLISTER, T. A. *In vitro* effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on rumen bacterial populations and fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.89, p.2252-2260, 2009.

WOLFE, R.M.; TERRILL, T.H.; MUIR, J.P. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 88, p.1060–1067, 2008.

CAPÍTULO II

Taninos como moduladores naturais do rúmen para controlar a metanogênese do gado de corte Zebu: amigos ou inimigos da produção de energia via biogás?

RESUMO

O gado *Bos taurus indicus* sob condições de pastagens tropicais de pobre qualidade durante a estação seca geram maior impacto ambiental e custo de produção. Os taninos condensados (TC) utilizados como aditivos naturais nas dietas de ruminantes podem ser uma ferramenta para modificar a população de arqueias no rúmen e assim ajudar a mitigar as emissões de metano dos bovinos Zebu nos sistemas tropicais. O objetivo do estudo foi investigar os efeitos dos TC sobre alterações na ecologia microbiana e nas emissões de metano *in vivo* no rúmen de bovinos de corte. Outro experimento utilizando biodigestores de bancada também foi realizado para avaliar o impacto do resíduo dos taninos dietéticos nos dejetos de bovinos sobre a produção de biogás. Foram utilizados seis bovinos adultos fistulados da raça Nelore distribuídos em quadrado latino 3 x 3 duplo. Os tratamentos consistiram em três dietas contendo 0%, 1,25% e 2,5% de TC de extrato de acácia negra (*Acacia mimosa*). O período experimental consistiu em 63 dias e a produção de metano foi medida usando a técnica de hexafluoreto de enxofre (SF₆) do dia 16 ao dia 21 de cada período de alimentação. A adição de extrato de acácia às dietas reduziu as emissões de metano diárias por animal. Porém, a diminuição nas emissões de metano ocorreu em consequência de maior da redução do consumo pelos animais do que pelo efeito direto sobre a microbiota. O presente trabalho mostrou que os TC suprimiram diretamente a comunidade de arqueias metanogênicas e aumentaram significativamente o número total de bactérias do rúmen. Nosso estudo também revelou que os taninos alteraram benéficamente as populações ruminais de *F. succinogenes* e *R. flavefaciens* e não tiveram efeito negativo sobre a produção do biogás a partir dos dejetos dos bovino. O extrato de acácia possui promissor potencial como aditivo nutricional para redução da metanogênese de bovinos de corte em sistemas tropicais.

Palavras-chave: Bovinos, metano, compostos fenólicos, técnica de rastreamento SF₆, sustentabilidade

CHAPTER II

Tannin as natural rumen modifier to control methanogenesis from Zebu beef cattle in tropical systems: friends or foe to biogas energy production?

ABSTRACT

Bos taurus indicus cattle grazing poor tropical pastures quality during the dry season have an increased environmental impact and cost of production. Condensed tannins (CT) as natural feed additive to modulate ruminal Archaea can help mitigate methane emissions from Zebu cattle in tropical systems. We investigated the effects of CT on *in vivo* methane emissions and rumen microbiota ecology in beef cattle. Batch experiments were also conducted to evaluate the impact of dietary tannins on the biogas production from beef cattle manure. Six adult rumen-cannulated Nelore cattle were used in a double 3 x 3 Latin square design. Treatments consisted of three diets containing 0%, 1.25% and 2.5% CT additive from acacia extract. The experimental period consisted of 63 days and methane production was measured using the sulphur hexafluoride (SF₆) technique from day 16 to day 21 of each feeding period. We show that adding acacia extract to the diets reduced daily methane emissions per animal. Therefore, methane suppression occurred higher by reduction intake than direct effect on methanogen Archaea. We also verified that CT directly suppressed Archaea community and significantly increased the total rumen bacteria. Our study also revealed that tannins benefit rumen *F. succinogenes* and *R. flavefaciens* populations and had no negative effect on biogas production from cattle manure. Acacia extract as additive feed has promising potential to be used as part of an overall nutritional strategy to reduce methanogenesis from Zebu beef cattle in tropical systems.

Keywords: Bovine, methane, phenolic compounds, SF₆ tracer technique, sustainability

2.1 INTRODUÇÃO

O Brasil, destaque no cenário mundial de produtos agropecuários, atualmente, possui o maior rebanho bovino comercial (218 milhões) e é o maior exportador mundial de carne bovina (IBGE, 2016). Quase a totalidade da produção brasileira de carne bovina é feita em sistemas de exploração extensivos de pastagens tropicais, que, combinadas com solos de fertilidade pobre e diminuição da qualidade das pastagens durante a estação seca, aumentam a produção de metano ruminal (BERNDT; TOMKINS, 2013). Além disso, a ampliação da pecuária em consequência do rápido crescimento populacional, inevitavelmente, aumentará a contribuição dos ruminantes para o aquecimento global nos principais países produtores de carne bovina como o Brasil (BERNDT; TOMKINS, 2013).

A contribuição da agropecuária para o efeito estufa leva os pesquisadores da área de nutrição animal a explorar alternativas naturais para produções animais sustentáveis (PATRA; SAXENA, 2009). Alguns tipos de produtos químicos vegetais, incluindo os taninos condensados, devido à sua atividade antimicrobiana, são alternativas naturais promissoras ao uso de ionóforos na redução das emissões de metano em ruminantes. Assim, o primeiro objetivo do estudo foi investigar os efeitos dos taninos condensados como aditivo alimentar para a manipulação da fermentação ruminal de bovinos Nelore. O segundo objetivo foi avaliar o impacto do resíduo dos taninos dietéticos nos dejetos de bovinos Nelore sobre a produção do biogás em biodigestores de bancada.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Área experimental

O experimento foi realizado no período de junho de 2016 a agosto de 2016, no setor de confinamento bovino da Prefeitura do Campus Fernando Costa e na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, ambos da Universidade de São Paulo e localizados no município de Pirassununga (SP), em parceria com a

Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos, SP) e a Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna, SP). O projeto foi avaliado pelo comitê Local de Ética em Experimentação Animal – CEUA e recebeu parecer favorável registrado como protocolo número: 2416120916.

2.2.2 Dietas e delineamento experimental

Foram utilizados seis bovinos adultos da raça Nelore fistulados no rúmen ($414 \pm 3,14$ kg) distribuídos aleatoriamente em baias individuais providas de comedouro e bebedouro. O experimento teve duração total de 63 dias, com cada período experimental possuindo duração de 21 dias, sendo 14 dias para adaptação dos animais e 7 dias para coleta das amostras.

O delineamento experimental utilizado foi Quadrado Latino 3 X 3 replicado. Os tratamentos foram compostos por três níveis de inclusão de TC de extrato de Acácia (*Acacia mimosa*): (1) controle (sem adição do extrato); (2) adição de 1,25% TC do extrato e (3) adição de 2,5% TC do extrato.

As dietas experimentais foram formuladas para atender aos requisitos de manutenção do NRC (2000) e consistiram em silagem de milho a 70% e concentrado a 30%. Os concentrados utilizados foram compostos por milho moído, farelo de soja e mistura mineral comercial. Os ingredientes da dieta e a composição química estão descritos na Tabela 2.1. O extrato comercial de tanino de Acácia (*Acacia mimosa*) (Seta®, Estância Velha, Brasil) utilizado na indústria de couro foi adicionado ao concentrado. Na dieta controle um material inerte (caulim) foi utilizado em substituição ao extrato de acácia para ajuste das fórmulas. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, pela manhã às 7:00 horas e à tarde às 16:00 horas.

2.2.3 Coletas realizadas e preparação das amostras

Para a determinação do consumo diário dos animais foi realizada pesagem e amostragem dos alimentos fornecidos e das respectivas sobras. As coletas das amostras de alimentos, sobras, fezes e urina ocorreram do 15º ao 19º dia em cada ciclo experimental. As amostras fecais foram colhidas diretamente do reto dos

animais. Ao final de cada período experimental, as amostras de alimentos, sobras e fezes foram pré-secas por um período de 72 h em estufa de circulação forçada com temperatura de 55°C. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey, em peneira com crivos de 1mm, acondicionadas em potes plásticos e identificadas para futuros procedimentos laboratoriais. O FDN indigestível (FDNi) foi utilizado como marcador interno para estimar a digestibilidade aparente dos nutrientes (COCHRAN et al., 1986). Amostras da dieta, sobras e fezes, previamente pré-secas e moídas, foram pesadas em sacos identificados de TNT e incubadas *in situ* no rúmen dos animais fistulados utilizados no experimento por período de 288 h. Após o período de incubação, as amostras foram colocadas em água com gelo, lavadas com água e colocadas em estufa a 105°C para posterior pesagem e determinação de FDNi.

2.2.4 Mensurações das emissões de metano através da técnica SF₆

No final de cada período experimental, mensurações das emissões de metano pelos animais foram realizadas utilizando a técnica de gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆) descrita por Johnson et al. (1994), adaptada por Primavesi et al. (2004) e aprimorada por Berndt et al. (2014). Tubos de permeação contendo SF₆ ultrapuro e taxa de liberação (TL) conhecida foram introduzidos no rúmen de cada bovino sete dias antes de iniciar as mensurações do primeiro período experimental. Os animais foram equipados com cangas de PVC e cabrestos coletores uma semana antes dos procedimentos de coleta para a adaptação dos mesmos aos aparatos (Figura 2.1).

A coleta dos gases expirados/eructados pelos bovinos foram feitas por um período de 24 h durante cinco dias consecutivos. As cangas foram retiradas e substituídas a cada 24 h sempre no mesmo horário. Os níveis ambientais de SF₆ e metano foram medidos diariamente através de conjunto coletores suspensos sobre as baias. Ao final de cada período de coleta, a amostra de gás coletada em cada canga foi analisada para as concentrações de metano e SF₆ na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, com o uso de cromatógrafo de gás (Hewlett Packard modelo 6890, Agilent, San Jose, EUA), conforme descrito por Johnson et al. (1995).

A taxa de emissão de metano foi calculada a partir das concentrações de CH₄ e de SF₆ medidas e da taxa conhecida de emissão de SF₆ (WESTBERG et al., 1998).

Tabela 2.1 - Proporções dos ingredientes (%) e composição química das dietas experimentais (g/kg MS).

<i>Dietas</i>	<i>Proporções ingredientes (%)</i>									
	Silagem	Concentrado	Milho	Farelo de soja		Mistura mineral		Caulim	Extrato de Acácia	
Controle	70,00	30,00	59,56	16,66		8,33		15,43	0,00	
1,25% TC	70,00	30,00	59,56	16,66		8,33		7,70	7,70	
2,5% TC	70,00	30,00	59,56	16,66		8,33		0,00	15,43	
<i>Alimento Forrageira</i>	MS	MO	FDN	FDA	EE	PB	TCS	TCF	TCP	TC
<i>Silagem de Milho</i>	329	302	498	307	20	132	nd	nd	nd	nd
<i>Concentrados</i>										
Controle	903	737	147	31	16	142	0	0	0	0
1,25% TC	899	769	135	34	19	138	40	0	1.3	42
2,5% TC	893	820	151	37	22	151	80	0	2,7	83

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; FDN: fibra em detergente neutro; FDA: fibra em detergente ácido; EE, extrato etéreo; PB: proteína bruta; TCS: taninos condensados solúveis; TCF: taninos condensados aderido à fibra; TCP: taninos condensados aderido a proteína; TC: taninos condensados; nd: não determinado. Fonte: Própria autoria.

2.2.5 Parâmetros ruminais

No último dia de cada período experimental, conteúdo ruminal de cada bovino foi coletado via fistula às 0, 4, 8 e 12 h do fornecimento da alimentação da manhã. Após a coleta, a amostra de conteúdo ruminal foi filtrada em duas camadas de tecido de campo cirúrgico, e o pH posteriormente medido através de peagâmetro. Deste fluido, foram retiradas três alíquotas de 4 mL cada. Uma alíquota do filtrado foi preservada em H₂SO₄ a 1% (1:1) para determinação de N-NH₃ e outras duas alíquotas foram reservadas para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e qPCR. Todas foram então congeladas a -20°C para posteriores análises.

Figura 2.1 – Bovino equipado com os aparatos de coleta

Fonte: Própria autoria.

2.2.6 Ensaio de produção de biogás a partir dos dejetos dos bovinos

Para avaliar o potencial de produção de biogás e metano dos dejetos dos bovinos foram utilizados biodigestores tipo batelada constituídos de garrafas PET de mesmo formato, mesma capacidade e mesmo fabricante. Os tratamentos utilizados foram: (1) dejetos de bovinos alimentados com a dieta controle (sem TC); (2) dejetos de bovinos alimentados com a dieta contendo 1,25% de TC e (3) dejetos de bovinos alimentados com a dieta contendo 2,5% TC. Amostras de fezes e urina coletadas em cada período experimental do ensaio *in vivo* foram utilizadas para compor os biodigestores. A composição química das amostras fecais utilizadas para compor os biodigestores está descrita na Tabela 2.2. Foram confeccionados 36 biodigestores com garrafas PET recicladas de 0,6 L cuidadosamente lavadas e secas antes do ensaio.

Os dejetos foram preparados utilizando-se 50% de fezes e 50% de urina diluídos em água para levar os sólidos totais (ST) a 8% (COMASTRI FILHO, 1981) e homogeneizados em liquidificador. Em cada garrafa foram adicionados em duplicata 200 mL de dejetos seguido de saturação com dióxido de carbono (CO₂) por 1 min. Todas as garrafas foram então seladas hermeticamente usando suas próprias tampas e incubadas por 90 dias a 35°C. Cada garrafa foi dimensionada com *head space* de 400 mL para armazenamento do biogás produzido, quantificado através de

transdutor de pressão (PressData 800®). A conversão de pressão em volume foi feita de acordo com o proposto por Theodorou et al. (1994). Para a mensuração da pressão, tampas de borracha, seladas com silicone, foram adaptadas às tampas originais das garrafas. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado com seis repetições (animal). Durante os horários de leitura foi armazenada uma alíquota do biogás em tubos Vacutainer® submetidos a vácuo para posterior mensuração do metano através de cromatografia gasosa.

2.2.7 Composição química

As análises de composição química das leguminosas foram realizadas no laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia (ZAZ) da FZEA-USP. Os teores de matéria seca (MS) (ID 930.15), matéria mineral (MM) (ID 942.05), extrato etéreo (EE) (ID 920.19), proteína bruta (PB) (ID 954.01) e fibras em detergente ácido (FDA) (ID 973.18) das plantas foram determinados de acordo com AOAC (1998). As determinações das fibras em detergente neutro (FDN) e da lignina foram realizadas segundo metodologia proposta por Mertens (2002). Os teores de fenóis e taninos totais foram realizados de acordo com Makkar et al. (1993) e Makkar (2003).

Tabela 2.2 - Composição química das fezes dos bovinos utilizadas para a preparação dos dejetos

<i>Dietas (%TC)</i>			
<i>Componentes</i>	Controle	1,25	2,5
<i>Sólidos Totais (%)</i>	17,79	16,59	17,64
<i>Sólidos Voláteis (%)</i>	13,52	13,21	14,64
<i>FDN (%)</i>	59,60	61,94	60,75
<i>FDA (%)</i>	45,54	49,04	50,66
<i>Lignina (%)</i>	24,52	29,46	30,36
<i>EE (%)</i>	0,78	0,51	0,48
<i>N (%)</i>	1,78	1,93	2,02
<i>PB (%)</i>	11,72	11,96	12,70

2.2.8 Quantificações microbianas

A extração de DNA nas amostras de rúmen e os procedimentos para quantificação absoluta de PCR em tempo real (qPCR) estão descritos no item 1.2.9 do capítulo 1.

2.2.9 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância e análise de regressão do tipo polinomial com auxílio do comando PROC MIXED e PROC REG do programa estatístico SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Valores de probabilidade entre 5 e 10% foram considerados como tendência.

O modelo estatístico utilizado para o ensaio *in vivo* e biodigestores foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + I_j + c_k + q_l + t_i + e_{ijkl}$$

onde Y_{ijk} é a variável dependente; μ = média geral; I_j = efeito aleatório do período j ($j=1,2,3$); c_k = efeito aleatório do animal k em cada quadrado ($k=1,2,3,4,5,6$); q_l = efeito aleatório do quadrado q ($q=1,2$); t_i = efeito fixo do tratamento i ($i=1,2,3$); e e_{ijkl} = erro aleatório $ijkl$.

O modelo estatístico utilizado para os parâmetro ruminais foi:

$$Y_{ijklt} = \mu + I_j + c_k + q_l + a_i + b_t + (ab)_{ti} + e_{ijklt}$$

onde Y_{ijkt} é a variável dependente; μ = média geral; I_j = efeito aleatório do período j ($j=1,2,3$); c_k = efeito aleatório do animal k em cada quadrado ($k=1,2,3,4,5,6$); q_l = efeito aleatório do quadrado q ($q=1,2$); a_i = efeito fixo do fator dieta i ($i=1,2,3$); b_t = efeito fixo do fator tempo t ($t=1,2,3,4$); $(ab)_{ti}$ = efeito da interação entre fator dieta i e tempo t ; e e_{ijklt} = erro aleatório $ijklt$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Consumo, digestibilidade e metano

Os valores médios de consumo, digestibilidade aparente e emissões de metano pelos animais estão apresentados na Tabela 2.3. As dietas contendo taninos diminuíram o consumo de matéria seca dos animais em até 28% em comparação com o controle. Os taninos também reduziram o consumo de PB, FDN, FDA e extrato etéreo pelos animais em comparação ao controle, seguindo um comportamento linear negativo. No entanto, a diminuição foi maior nos animais que consumiram 2,5% de TC. Não houve efeito dos taninos sobre a digestibilidade aparente da MS, PB e FDN. No entanto a digestibilidade da PB nos animais consumindo taninos tendeu a ser menor ($P=0,0722$). As dietas com taninos resultaram em maiores coeficientes de digestibilidade de EE. Constatou-se comportamento linear decrescente para produção de metano pelos animais. Os taninos diminuíram a emissão diária de metano pelos bovinos em até 33% em comparação com a emissão dos animais que consumiram a dieta controle. No entanto, tal efeito não foi significativo quando as emissões foram corrigidas por consumo de matéria seca (kg/kg CMS). Quando o metano foi expresso por peso corporal (kg/kg PV) também foi observada diminuição nas emissões dos animais que consumiram a dieta com taninos.

Tabela 2.3 - Consumo, digestibilidade e emissões de metano pelos bovinos suplementados com taninos

	<i>Dietas (% TC)</i>					
	Controle	1,25	2,5	EP	<i>p</i> -valor	<i>Modelo</i>
<i>CMS (kg/dia)</i>	9,79 ^a	8,49 ^b	7,08 ^c	0,7994	<0,0001	Linear
<i>CPB (kg/dia)</i>	1,36 ^a	1,19 ^b	1,05 ^c	0,1093	0,0002	Linear
<i>CFDN (kg/dia)</i>	3,88 ^a	3,36 ^b	2,92 ^c	0,2394	0,0001	Linear
<i>CFDA (kg/dia)</i>	2,19 ^a	1,94 ^b	1,65 ^c	0,1324	0,0003	Linear
<i>CEE (kg/dia)</i>	0,19 ^a	0,17 ^a	0,15 ^b	0,0192	0,0034	Linear
<i>DMS (%)</i>	69,61 ^a	67,68 ^a	67,41 ^a	7,3128	0,7858	n.s
<i>DPB (%)</i>	73,37 ^a	65,63 ^a	67,63 ^a	9,5882	0,0722	n.s
<i>DEE (%)</i>	86,85 ^b	90,18 ^a	91,29 ^a	2,5373	0,0036	n.s
<i>DFDN (%)</i>	52,00 ^a	42,99 ^a	47,99 ^a	11,2800	0,2550	n.s
<i>CH₄ (g/dia)</i>	190,90 ^a	158,54 ^b	128,24 ^c	20,5181	0,0003	Linear
<i>kgCH₄ kgCMS</i>	0,019 ^a	0,018 ^a	0,018 ^a	0,00101	0,7912	n.s
<i>kgCH₄ kgPV</i>	0,39 ^a	0,33 ^b	0,27 ^c	0,02971	0,0008	Linear

*médias seguidas por letras distintas nas linhas diferem entre si (teste de Tukey, a 5%); EP: erro padrão da média; CMS: consumo de MS; CPB: consumo de PB; CFDN: consumo de FDN; CFDA: consumo de FDA; CEE: consumo de extrato etéreo; DMS: digestibilidade aparente da MS; DPB: digestibilidade aparente da PB; DEE: digestibilidade aparente do extrato etéreo; DFDN: digestibilidade aparente do FDN; n.s: não significativo.

2.3.2 Parâmetros Ruminais

Os parâmetros ruminais dos bovinos às 0, 4, 8 e 12 h após alimentação estão representados nas Figuras 2.2 a 2.10. Os tratamentos controle e 1,25% de TC apresentaram comportamento linear decrescente para o pH após tempo de alimentação. Já para a dieta com 2,5% de TC foi observado comportamento não linear. A adição de 1,25% de TC resultou em queda no pH ruminal 4 h após a alimentação. Por sua vez não houve alterações nos valores de pH entre as dietas nos outros horários. As concentrações de amônia ruminal às 0, 4 e 12 h foram semelhantes em todas as dietas. Foi observado comportamento linear decrescente para os níveis de amônia nos animais que consumiram a dieta controle. A dieta contendo 2,5% TC resultou em concentrações de amônia maiores após 8 h em comparação com a dieta controle. Tanto no controle quanto na dieta com 1,25% TC, às 2, 4, 6 e 8 h os níveis de amônia diminuíram, mas permaneceram elevados após 10 horas.

Figura 2.2 - Valores de pH ruminal em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.3 - Concentrações de amônia ruminal em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.4 - Concentrações de AGCC em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.5 - Concentrações ruminiais de acetato em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.6 - Concentrações ruminiais de propionato em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.7 - Concentrações ruminiais de butirato em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.8 - Concentrações ruminiais de isobutirato em bovinos suplementados com taninos

Figura 1 - Concentrações ruminiais de isovalerato em bovinos suplementados com taninos

Figura 2.10 - Concentrações ruminiais de valerato em bovinos suplementados com taninos

A adição de 2,5% de TC não afetou as concentrações ruminiais de acetato, butirato, isobutirato, isovalerato, valerato e AGCC total. Todavia, os dados mostram claramente que a produção de acetato seguiu diferentes padrões de fermentação. A 1,25% de TC, foi observado um aumento do nível de acetato após a alimentação seguido de uma ligeira diminuição 4 horas após, enquanto que para os animais consumindo a dieta controle observou-se comportamento oposto. Quando 2,5% de TC foi adicionado, os teores de acetato apresentaram um pequeno aumento 4 horas após a alimentação, seguido por diminuição após 8 horas. Ainda com relação aos valores de AGCC, antes da alimentação, os animais que consumiram taninos apresentaram maiores concentrações de propionato comparados aos animais ingerindo a dieta controle. Ao contrário, a 1,5% TC, os animais apresentaram menores níveis ruminiais de butirato antes da alimentação.

2.3.3 Quantificações Microbianas

A população total de bactéria no rúmen foi significativamente alterada pelas dietas com taninos (Figura 2.11). A adição de TC, principalmente a 1,25%, resultou em maior número total de bactérias ruminiais tanto na pré-alimentação quanto após

12 h. No entanto, depois de 4 h de alimentação, a maior abundância de bactérias foi detectada nos animais com a dieta de 2,5% de TC. Às 8 h depois da alimentação, as dietas com taninos tenderam ($P=0,0766$) a aumentar o número de total de bactérias no rúmen.

Figura 2.11 - Efeito da suplementação de taninos sobre a quantificação ruminal de bactérias totais em bovinos de corte

Os resultados quantitativos da PCR em tempo real mostraram que o número de *F. succinogenes* no rúmen de bovinos Zebu que receberam dietas com 1,5% de TC foram maiores que a dieta controle em todos os horários após a alimentação (Figura 2.12). As 8h após a alimentação a dieta com 2,5% de TC também apresentou valores de *F.succinogenes* mais elevados que a deita controle. A adição de taninos a 1,5% também proporcionou aumento na população de *R. flavefaciens* às 0 e 4 horas após a ingestão da dieta (Figura 2.13). Nos outros horários, apesar da população ruminal de *R. flavefaciens* ter sido consideravelmente maior nos animais consumindo taninos, tal aumento não foi estatisticamente significativo.

Figura 2.12 - Efeito da suplementação de taninos sobre a quantificação ruminal de *F. succinogenes* em bovinos de corte

Figura 2.13 - Efeito da suplementação de taninos sobre a população ruminal de *R. flavefaciens* em bovinos de corte

As dietas com taninos reduziram significativamente a população ruminal de arqueias metanogênicas em quase todos os horários após a alimentação, exceto após às 8 horas (Figura 2.14). Não houve diferença na população de protozoários após 4, 8 e 12 horas da alimentação entre os animais que receberam

suplementação com taninos e aqueles que não receberam (Figura 2.15). No entanto, no período antes da alimentação os animais consumindo 2,5 de TC % apresentaram menor população de protozoários que os animais com a dieta controle.

Figura 2.14 - Efeito da suplementação de taninos sobre a população ruminal de arqueias em bovinos de corte

Figura 2.15 Efeito da suplementação de taninos sobre a população ruminal de protozoários em bovinos de corte

3.4 Biodigestores

A produção de sólidos totais, sólidos voláteis, biogás e metano a partir dos dejetos de bovinos estão descritos na Tabela 11. Não foram observados efeito dos taninos sobre os parâmetros avaliados. Os dejetos bovinos contendo TC não afetaram a produção total de sólidos totais, sólidos voláteis, biogás e metano.

Tabela 2.4 - Efeito dos taninos sobre a produção de biogás e metano por kg de sólidos totais (ST) e voláteis (SV) em dejetos de bovinos de corte

	<i>Dietas (% TC)</i>				
	Controle	1,25	2,5	EP	<i>p-valores</i>
*ST (%)	7,29 ^a	7,61 ^a	8,28 ^a	1,4612	0,7805
SV (%)	5,68 ^a	6,36 ^a	7,21 ^a	1,2599	0,5322
mL biogas	944,4 ^a	1047,6 ^a	810,8 ^a	286,73	0,7410
mL biogas/ g ST	13,61 ^a	16,92 ^a	11,30 ^a	4,4421	0,6811
mL biogas/g SV	17,15 ^a	20,90 ^a	13,30 ^a	5,4680	0,6413
mL CH ₄	603,3 ^a	792,3 ^a	708,1 ^a	206,33	0,8262
mL CH ₄ / g ST	8,99 ^a	13,48 ^a	10,40 ^a	3,9007	0,7444
mL CH ₄ / g SV	11,26 ^a	16,78 ^a	12,33 ^a	4,8748	0,7388

2.4 DISCUSSÃO

Como era esperado, a adição de TC às dietas reduziu o consumo voluntário dos animais. A menor ingestão de nutrientes observada provavelmente se deve à sensação de adstringência e amargor na mucosa oral provocada pelos taninos (GLENDINNING, 1994). No estudo, observou-se ainda que a intensidade do efeito na redução foi dose dependente, pois os animais suplementados com 2,5% apresentaram maiores reduções no consumo que os animais com 1,25%. Em concordância ao observado, Priolo et al. (2000) e Dschaak et al. (2011) relataram reduções na ingestão voluntária em vacas suplementadas com 2,5% de TC e 3% de quebracho, respectivamente.

Apesar do menor consumo de nutrientes observado nos animais, a digestibilidade aparente da MS, PB e FDN não diferiu entre os tratamentos,

indicando que o complexo tanino-proteína não alterou o metabolismo dos nutrientes presentes na dieta e os fluxos de N no duodeno. Portanto, possivelmente, os TC do extrato utilizado podem apresentar uma maior afinidade à proteína microbiana do que à proteína da dieta. Em concordância a tais achados, Beauchemin et al. (2007) também não observaram alterações na digestibilidade da MS e FDN com a adição de extrato de quebracho na dieta de bovinos. No entanto, em contradição ao nosso estudo, os mesmos autores verificaram reduções na digestibilidade da PB pelos animais. Estudos reportados por Cieslak et al. (2012) também não identificaram alterações na digestibilidade aparente de MS e FDN em dietas com ou sem taninos.

A maior digestibilidade de EE nos animais suplementados com taninos pode ser consequência de uma redução na biohidrogenação dos lipídios pela microbiota ruminal, ocorrendo um aumento dos ácidos graxos poliinsaturados dietéticos disponíveis para absorção no intestino delgado, e devido a sua maior solubilidade de micelas e a sua menor resistência a camada de água inerte, estes são mais rapidamente absorvidos no intestino do que os ácidos graxos saturados (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

O presente estudo fornece evidências claras de que os taninos inibiram a população de arqueias ruminais nos bovinos. Os resultados mostraram também que a suplementação de taninos condensados a 1,25 e 2,5% na dieta reduziram as emissões diárias de metano pelos animais em 17 e 33%, respectivamente. Efeitos semelhantes foram observados em estudos *in vivo* relatados por Cieslak et al. (2012). No entanto, nenhuma redução foi verificada quando as emissões foram corrigidas por kg de consumo, o que significa que a supressão de metano se deve mais à diminuição da ingestão do que propriamente ao efeito direto sobre a população de arqueias.

Apesar da ausência de efeito na produção de metano por kg de consumo, a supressão nas arqueias metanogênicas no rúmen dos animais suplementados com TC foi muito significativa, e indicam que estes realmente possuem efeito deletério sobre tais microrganismos, podendo futuramente, substituírem moduladores ruminais químicos como os ionóforos.

Entretanto, a interferência dos taninos sobre a palatabilidade dos animais é o grande desafio para que se consiga uma resposta biológica eficaz sem, contudo,

interferir no rendimento animal. A redução do consumo frequentemente relatada em estudos com taninos, interfere no efeito desejado sobre a microbiota do animal e acabam mascarando negativamente a ação destes. Por conta da adstringência, os animais não ingerem a quantidade de TC que de fato foi adicionado a dieta e os efeitos diretos sobre a população de arqueias acabam não sendo observados nos estudos *in vivo*. Isso explica parte das divergências entre estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando taninos conhecidamente reativos. Os efeitos diretos dos taninos sobre arqueias metanogênicas já foram descritos previamente em alguns estudos *in vitro* (BHATTA et al., 2009; TAN et al., 2011; JAYANEGARA, et al., 2015; SZCZECOWIAK et al., 2016) mas seus efeitos sobre estudos *in vivo* ainda não foram suficientemente documentados (MOHAMMED et al 2011; SZCZECOWIAK et al., 2016).

Assim como a digestibilidade, os taninos não alteraram as concentrações de AGCC, butirato, isobutirato e acetato no rúmen. Tais achados corroboram os dados *in vitro* descritos por Szczechowiak et al. (2016) em dietas com extrato de *Vaccinium vitis idaea*. Com exceção das concentrações de acetato, Cieslak et al. (2012) também não encontraram diferenças para os teores ruminais de AGCC, butirato e isobutirato em vacas consumindo dietas com e sem suplementação de taninos.

Entretanto, mais importante que a comparação estatística das médias entre os tratamentos dentro de cada horário após a alimentação, é a análise do padrão de curva de fermentação seguido por cada dieta durante as 12 horas após a ingestão. Ao analisar o tratamento controle observamos diminuição nos níveis de acetato até 4 horas depois da alimentação, seguido de aumento após esse horário; o que para uma dieta rica em volumoso (70%), se justifica pelo maior lag time e tempo de degradação dos carboidratos estruturais pelos microrganismos. Em consequência da rápida degradação dos carboidratos não-estruturais, um aumento nos valores de propionato após 4 horas de alimentação foi observado. Já a diminuição de butirato pelos animais consumindo o tratamento controle se justifica pela maior demanda de energia pelas papilas ruminais em consequência das maiores concentrações de AGCC nestes horários. Ainda com relação a dieta controle, a maior redução nos níveis de N-NH₃ com 8 h de alimentação provavelmente se deve a maior

incorporação destes pelos microrganismos, proporcionada pelo acréscimo da disponibilidade de AGCC.

No entanto, conforme podemos observar, as dietas com a adição de taninos, mais destacadamente ao nível de 1,25%, não seguiram o mesmo padrão de fermentação que a dieta controle. Ao contrário do esperado, nas primeiras horas após a alimentação, a dieta com 1,25% de TC resultou em concentrações de AGCC e acetato maiores, e de propionato menores; seguida de diminuição nos níveis totais de AGCC, acetato e propionato após 8 h de fermentação, e com 12 h, novamente aumento nos níveis de acetato e propionato.

Com relação as concentrações ruminiais de butirato, sua importância sobre o crescimento do epitélio ruminal para a absorção (SAKATA; TAMATE, 1978) resultou em concentrações contrárias aos demais ácidos graxos. As diferenças fermentativas observadas entre as dietas com e sem taninos, provavelmente são resultado de alterações na rota do metabolismo ruminal ocasionada por mudanças no perfil microbiano (confirmado pelas análises moleculares) em resposta aos efeitos antimicrobianos dos taninos.

Após 4 horas de fermentação, mesmo sob concentrações similares de AGCC, acetato, propionato, butirato e N-NH_3 , os animais que consumiram a dieta com 1,25% de TC, apresentaram menores valores de pH em relação ao controle. Uma possível explicação para essa queda no pH seja um aumento na concentração de H^+ no rúmen ocasionada pela menor população de arqueias observada neste período. As arqueias ao utilizarem o H^+ , um dos produtos finais gerados pela degradação microbiana, na formação do CH_4 (BEAUCHEMIN et al., 2009), contribuem na estabilização do pH e saúde ruminal. Talvez, o hipotético aumento de H^+ possa também estar associado as maiores concentrações de propionato e baixas concentrações de isobutirato observados no rúmen dos animais suplementados com taninos antes do fornecimento da alimentação. Segundo Hino e Russel (1985), inibições na metanogênese, alteram a relação intracelular de NADH/NAD , e esta última está intimamente associada a fermentação dos ácidos graxos de cadeia ramificada.

Ainda com relação aos parâmetros ruminiais, os resultados mostraram, surpreendentemente, que as concentrações de amônia ruminal após 8 h de

alimentação foram mais elevadas para os animais que receberam a dieta com maior nível de TC (2,5%), sugerindo que os taninos não afetaram a desaminação, entretanto, altos valores de N-NH₃ no rúmen indicam que provavelmente ocorreu uma incorporação ineficiente de amônia na proteína microbiana. Em concordância, Osakwe et al. (2004) também observaram maiores níveis de amônia e redução no pH ruminal 5 h após a alimentação em ovelhas consumindo dietas com plantas ricas em taninos.

Através das análises moleculares foi possível identificar alterações na população de certos grupos de microrganismos ruminais ocasionada pelos taninos. No entanto, devido à complexidade do ecossistema ruminal e das limitadas investigações microbiológicas, pouco se sabe ainda, sobre as mudanças provocadas sobre a dinâmica bacteriana pelos taninos reativos.

Nosso estudo fornece novas informações sobre interação microbiana ruminal e os TC, pois em geral, as alterações dos taninos sobre a microbiota são atribuídas a inibição da adesão destes últimos a parede celular, ocasionando uma menor degradação da fibra e reduzindo o crescimento de bactérias celulolíticas (PATRA; SAXENA, 2011). No entanto, ao contrário do esperado, as dietas com taninos aumentaram as duas principais espécies de bactérias celulolíticas (*F. succinogenes* e *R. flavefaciens*) e também o número total de bactérias no rúmen. O aumento no número total de bactérias no rúmen pelos taninos foi previamente descrito em estudo *in vitro* realizado por Khiaosa-Ard et al. (2009) e Bhatta et al. (2009). Ambos atribuíram o aumento no total de bactérias a redução na predação pelos protozoários cujas populações foram menores para os tratamentos com taninos. Entretanto, em nosso estudo essa explicação não se aplica, já que só foi verificado efeito inibitório dos taninos sobre a população de protozoários dos bovinos no período antes da alimentação. Acreditamos que o aumento no número total de bactérias seja consequência do maior número das espécies celulolíticas, principalmente, *F. succinogenes*. Esta última parece estar associada positivamente aos taninos. Em corroboração ao presente estudo, Chanthakhoun et al. (2011) e Min et al. (2012) também encontraram aumento em *F. succinogenes* nos tratamentos com adição de taninos.

O fato de as dietas com taninos reduzirem a população de arqueias metanogênicas e ao mesmo tempo resultarem em impactos positivos sobre a população das celulolíticas, indica que estes são componentes químicos naturais alternativos a moduladores ruminais químicos. No entanto, mais estudos são necessários para o correto conhecimento acerca de seus reais efeitos, como por exemplo, observações sobre outros grupos fermentadores.

Os taninos presentes nas fezes dos animais não reduziram a produção de biogás e o metano nos biodigestores. Dietas ricas em taninos condensados produzem material fecal com altas concentrações de TC, pois estes componentes não são absorvidos no trato gastrintestinal, e sua excreção nas fezes de ruminantes podem ser acompanhadas de mudanças conformacionais dentro de sua molécula (TERRIL et al., 1994). A ausência de efeito mitigador dos TC em fezes de bovinos também foi verificada em estudo realizado por Hao et al. (2011). Tais autores observaram que o esterco de bovinos proveniente de dieta com adição de taninos não resultou em diminuição nas emissões de CO₂, CH₄ e N₂O durante o processo de compostagem.

O biogás, produzido do esterco dos animais, é uma forma de energia renovável que não polui o meio ambiente e contribui como uma segunda fonte de renda para muitos produtores; por isso, a não interferência dos taninos sobre a produção deste tipo de energia é outro aspecto positivo observado em nosso estudo.

2.5 CONCLUSÕES

Os bovinos suplementados com extrato de acácia produziram menos metano por dia comparado com os animais com a dieta controle. Embora as reduções nas emissões de CH₄ tenha sido resultado de uma menor ingestão alimentar, os taninos não afetaram a digestibilidade dos nutrientes e nem os parâmetros ruminais. Além disso, a análise molecular revelou que os TC afetaram benéficamente as populações de *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* e o número total de bactérias ruminais. Os resultados também mostraram que os taninos reduziram significativamente a

população de arqueias. Outro fator positivo, verificado pelo estudo foi a ausência de efeito negativo dos TC sobre a produção de biogás pelos dejetos dos animais.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed., 4 rev., 1998. 2v.

BEAUCHEMIN, K. A.; MCALLISTER, T. A.; MCGINN, S. M. (2009). Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. Nutrition and Natural Resources*, v. 4, p.1-18, 2009.

BERNDT, A.; BOLAND, T.; DEIGHTON, M. H.; GERE, J.I.; GRAINGER, C.; HEGARTY, R.S.; IWAASA, A. Guidelines for use of Sulphur hexafluoride (SF₆) trace technique to measure enteric methane emissions from ruminants. 1 ed. Wellington: **Ministry for Primary Industries**, v.1 p. 166, 2014.

BERNDT, A.; TOMKINS, N. W. Measurement and mitigation of methane emissions from beef cattle in tropical grazing systems: a perspective from Australia and Brazil. *Animal*, v. 7, p. 363-372, 2013.

BHATTA, R.; UYENO, Y.; TAJIMA, K.; TAKENAKA, A.; YABUMOTO, Y.; NONAKA, I.; ENISHI, O.; KURIHARA, M. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, v.92, p.5512-5522, 2009.

CIESLAK, A.; ZMORA, P.; PERS-KAMCZYC, E.; SZUMACHER-STRABEL, M. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation *in vivo*. *Animal Feed Science and Technology*, v.176, p.102-106, 2012.

COCHRAN, R.C.; ADAMS, D.C.; WALLACE, J.D.; GALYEAN, M.L. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1476-1483, 1986.

COMASTRI FILHO, J. A.; Biogás, Independência Energética do Pantanal Matogrossense. **Circular Técnica**, n. 9, 1981.

DENMAN, S.E.; MCSWEENEY, C.S. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p.572-582, 2006.

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY, T.M.; KENNETH, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. **Journal of Immunological Methods**. v. 354, p.34–39, 2010.

DSCHAAK, C. M.; WILLIAMS, C. M.; HOLT, M. S.; EUN, J. S.; YOUNG, A. J.; MIN, B. R. Effects of supplementing condensed tannin extract on intake, digestion, ruminal fermentation, and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.2508-2519, 2011.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p.1768-1771, 1961.

FERRAZ, J. B. S.; FELÍCIO, P. E. Production systems—An example from Brazil. **Meat Science**, v. 84, p. 238-243, 2010.

GETACHEW, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Tropical browses: contents of phenolic compounds, *in vitro* gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and *in vitro* gas production. **Journal of Agricultural Science**, v.139, p.341-352, 2002.

GLENDINNING, J. I. Is the bitter rejection response always adaptive? **Physiology & Behavior**, v.56, p.1217-1227, 1994.

GODORNES, C.; LEADER, B.T.; MOLINI, B.J.; CENTURION-LARA, A.; LUKEHART, S.A. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. **Cytokine**, v.38, p. 1, 2007.

HAO, X.; BENKE, M. B.; LI, C.; LARNEY, F. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; MCALLISTER, T. A. Nitrogen transformations and greenhouse gas emissions during composting of manure from cattle fed diets containing corn dried distillers grains with solubles and condensed tannins. **Animal Feed Science and Technology**, v.166, p.539-549, 2011.

HINO, T. S. U. N. E. O.; RUSSELL, J. B. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.50, p.1368-1374, 1985.

IBGE, 2016. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (in Portuguese). <http://www.ibge.gov.br/home/>

JAYANEGARA, A.; GOEL, G.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population *in vitro*. **Animal Feed Science and Technology**, v.209, p.60-68, 2015.

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

JOHNSON, K.; HULYER, M.; WESTBERG, H.; ZIMMERMAN, P. Measurement of methane emissions from ruminant livestock using a sulfur hexafluoride tracer technique. **Environmental Science & Technology**, v. 28, p. 359-362, 1994.

MOHAMMED, R.; ZHOU, M.; KOENIG, K. M.; BEAUCHEMIN, K. A.; GUAN, L. L. Evaluation of rumen methanogen diversity in cattle fed diets containing dry corn distillers grains and condensed tannins using PCR-DGGE and qRT-PCR analyses. **Animal Feed Science and Technology**, v.166, p.122-131, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7 rev. ed. Washington, DC. National Academy Press, 2000. 242p.

OSAKWE, I. I.; STEINGASS, H.; DROCHNER, W. Effect of dried *Elaeis guineense* supplementation on nitrogen and energy partitioning of WAD sheep fed a basal hay diet. **Animal Feed Science and Technology**, v.117, p.75-83, 2004.

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

POULSEN, M.; SCHWAB, C.; JENSEN, B. B.; ENGBERG, R. M.; SPANG, A.; CANIBE, N.; HØJBERG, O.; MILINOVICH, G.; FRAGNER, L.; SCHLEPER, C.; WECKWERTH, W.; LUND, P.; SCHRAMM, A.; URICH, T. Methylophilic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. **Nature Communications**, v. 4, p.1428, 2013.

PRESTON, T.R. Biological and chemical analytical methods. In Preston, T.R. **Tropical Animal Feeding: a manual for research workers**. Rome: FAO, 1995, p. 191-264.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R.T.S.; PEDREIRA, M.S.; LIMA, M.A.; BERCHIELLI, T.T.; DEMARCHI, J.J.A.A.; MANELLA, M.Q.; BARBOSA, P.F.; JOHNSON, K.A.; WESTBERGG, H.H. **Técnica do gás traçador SF6 para medição de campo do metano ruminal em bovinos: adaptações para o**

Brasil. 1ª ed., São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2004. 76p. (Documentos 39).

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: Effects on lamb growth performance and meat quality. **Journal of Animal Science**, v. 78, p.810–816, 2000.

SAKATA, T.; TAMATE, H. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. **Journal of Dairy Science**, v.61, p.1109-1113, 1978.

SALLAM, S.; BUENO, I.C.S.; NASSER, M.E.; ABDALLA, A.L. Effect of eucalyptus (*Eucalyptus citriodora*) fresh or residue leaves on methane emission *in vitro*. **Italian Journal of Animal Science**, v. 9, p. 299-303, 2010.

SAS (2000) SAS User's Guide. Cary, NC: Statistics SAS Institute, Inc. SAS 2000 SAS User's Guide. Cary, NCStatistics SAS Institute, Inc.

SYLVESTER, J.T.; KARNATI, S. K.; YU, Z.; MORRISON, M.; FIRKINS, J. L. Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. **The Journal of Nutrition**, v.134,p. 3378-3384, 2004.

TAN, H. Y.; SIEO, C. C.; LEE, C. M., Abdullah, N., Liang, J. B., & Ho, Y. W. Diversity of bovine rumen methanogens in vitro in the presence of condensed tannins, as determined by sequence analysis of 16S rRNA gene library. **The Journal of Microbiology**, v.49, p.492-498, 2011.

TERRIL, T.H.; ROWAN, A.M.; DOUGLAS, G.B.; BARRY, T.N. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. **Journal of the Science of Food and agriculture**, v.58, p.321-329, 1992.

TERRILL, T. H.; WAGHORN, G. C.; WOOLLEY, D. J.; MCNABB, W. C.; BARRY, T. N. Assay and digestion of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. **British Journal of Nutrition**, v.72, p.467-477, 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 of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 185-197, 1994.

WESTBERG, H.H.; JOHNSON, K.A.; COSSALMAN, M.W.; MICHAL, J.J. **A SF₆ tracer technique: methane measurement from ruminants**. Pullman: Washington State University, 1998. 40p.

WOLFE, R.M.; TERRILL, T.H.; MUIR, J.P. Drying method and origin of standard affect condensed tannin (CT) concentrations in perennial herbaceous legumes using simplified butanol-HCl CT analysis. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 88, p.1060–1067, 2008.

CAPÍTULO III

Taninos em fezes bovinas e a dinâmica microbiana do solo: ambientalmente amigável?

RESUMO

Atualmente, observa-se um crescente aumento no interesse da comunidade científica pelo estudo de compostos bioativos de plantas, como os taninos, em alternativa ao uso de moduladores ruminais químicos para mitigar as emissões de metano pelos ruminantes no setor agropecuário. No entanto, os taninos não alteram somente o microbioma ruminal, sua presença nas fezes dos animais podem produzir também uma série de mudanças sobre o microbioma solo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de fezes bovinas ricas em taninos condensados (TC) sobre a dinâmica da população microbiana do solo. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação por um período de 60 dias, constituído de três tratamentos de solo e um controle: (1) fezes de bovinos com dieta controle; (2) fezes de bovinos com dieta com 1,25% de TC; (3) fezes de bovinos com dieta com 2,5% de TC; (4) controle sem fezes. Os taninos aumentaram a excreção de nitrogênio fecal e reduziram a taxa de decomposição do solo. As fezes com taninos resultaram em maiores quantidades no número total de bactérias no solo e estimularam o crescimento dos microrganismos dos filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (α -*Proteobacteria*) e *Firmicutes*. O estudo demonstrou que os taninos alteraram a reciclagem de nitrogênio e também de outros nutrientes no sistema solo-animal, aumentando a entrada de N fecal, a persistência da matéria orgânica no solo e a dinâmica microbiana do solo.

Palavras-chave: ciclo de nutrientes, dejetos da pecuária, microrganismos solo, sustentabilidade, resíduos de polifenóis

CHAPTER III

Bovine feces containing tannins and soil microbial dynamics: are they environmentally friendly?

ABSTRACT

There is now growing interest by scientific community in the study of bioactive compounds from plants, such as tannins, as an alternative to the use of rumen chemical modulators to mitigate methane emissions by ruminants in livestock sector. However, the tannins do not only alter the ruminal microbiome, their presence in the feces of the animals also produces a series of changes on soil microbiome. The study was carried out to investigate the effect of bovine feces rich in condensed tannins (TC) on the dynamics of soil microbial population. The experiment was conducted in a greenhouse for a period of 60 days, consisting of three soil treatments and one control: (1) feces from cattle with control diet; (2) feces from cattle with 1.25% TC diet; (3) cattle feces with 2.5% TC diet; (4) control without feces. Tannins increased the excretion of fecal nitrogen and reduced the rate of soil decomposition. The feces with tannins resulted in higher bacterial numbers in the soil and stimulated the growth members of the *Actinobacteria*, *Proteobacteria* (α -*Proteobacteria*) and *Firmicutes*. The study showed that tannins altered nitrogen recycling and other nutrients inputs in soil-animal system by increasing fecal N inputs, organic matter persistence and soil microbial dynamic.

Keywords: cycle of nutrients, livestock manure, soil microorganisms, sustainability, polyphenol residues

3.1 INTRODUÇÃO

Os taninos são componentes químicos naturais capazes de inibir a comunidade de arqueias metanogênicas no rúmen e assim reduzir a contribuição da agropecuária nas mudanças climáticas (PATRA; SAXENA 2011; BUENO et al., 2015). No entanto, estudos para a mitigação de metano com o uso de estratégias nutricionais alternativas, como os taninos, não descrevem qual o efeito ambiental destas estratégias nos resíduos da produção.

A composição das fezes é afetada pela dieta consumida pelos ruminantes, incluindo as concentrações de TC (MUIR, 2011), pois estes componentes não são digeridos no trato gastrointestinal dos ruminantes sendo eliminados nas fezes (TERRIL et al., 1994). Estes, por sua vez, através de sua atividade antimicrobiana alteram não só as populações microbianas das fezes como também interferem na dinâmica de nutrientes do solo (MUIR, 2011). Pesquisas recentes indicam que a presença de taninos em dietas de ruminantes pode produzir uma série de efeitos "não intencionais" no ambiente (MUIR, 2011).

Além disso, dietas ricas em taninos aumentam a excreção metabólica de nitrogênio fecal, devido a alteração do local do metabolismo do N do rúmen para os intestinos pelo complexo TC-proteína (PATRA; SAXENA, 2011), influenciando no processo de ciclagem do nitrogênio nos ecossistemas terrestres (KRAUS et al., 2003). Como há pouca evidência dos efeitos diretos dos taninos sobre os microrganismos do solo dentro do ecossistema dos ruminantes. O objetivo do estudo foi investigar o efeito de fezes bovinas ricas em taninos condensados (TC) sobre a dinâmica da população microbiana do solo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das fezes

Para a obtenção das fezes com taninos, foram utilizados seis bovinos adultos da raça Nelore fistulados no rúmen ($414 \pm 3,14$ kg) distribuídos aleatoriamente em

baías individuais providas de comedouro e bebedouro no setor de confinamento da Prefeitura do campus FZEA/USP. O projeto foi avaliado pelo comitê Local de Ética em Experimentação Animal – CEUA e recebeu parecer favorável registrado como protocolo número: 2416120916. Os animais receberam dietas com três níveis de inclusão de TC de extrato de Acácia (*Acacia mimosa*): (1) controle (sem adição do extrato); (2) adição de 1,25% TC do extrato e (3) adição de 2,5% TC do extrato.

As dietas consistiram em silagem de milho a 70% e concentrado a 30%. Os concentrados utilizados foram compostos por milho moído, farelo de soja e mistura mineral comercial. Os ingredientes da dieta e a composição química estão descritos no item 2.2 do capítulo II. Foi utilizado o extrato comercial de tanino de Acácia (*Acacia mimosa*) (Seta®, Estância Velha, Brasil) adicionado ao concentrado. Na dieta controle um material inerte (caulim) foi utilizado em substituição ao extrato de acácia para ajuste das fórmulas. As dietas foram distribuídas aos animais utilizando-se o esquema em quadrado latino 3 X 3 duplo, com cada período experimental possuindo duração de 21 dias. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, pela manhã às 7:00 horas e à tarde às 16:00 horas por 63 dias. Ao final de cada período experimental, amostras fecais foram colhidas diretamente do reto dos animais durante cinco dias consecutivos e congeladas (Figura 3.1). A análise da composição química das fezes foi realizada conforme metodologias descritas no capítulo 2, item 2.7.

Figura 3.1 - Diferenças na coloração das fezes dos bovinos conforme níveis de TC incluídos na dieta (da esquerda para direita: controle, 1,25% e 2,5% TC).

Fonte: Própria autoria.

3.2.2 Ensaio casa de vegetação

Para a avaliação dos efeitos dos TC excretados nas fezes dos bovinos sobre a população de bactérias do solo foi realizado experimento em casa de vegetação por um período de 60 dias. O ensaio foi conduzido em vaso com capacidade de 2,0 kg de solo. Foi utilizado solo vermelho distrófico de textura média argilosa sem histórico de recebimento de taninos coletado em 22 de julho de 2016 no Campus da USP, em Pirassununga, SP. A composição química do solo está descrita na Tabela 3.1. Os tratamentos aplicados foram realizados em delineamento experimental inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos de solo e um controle, com seis repetições: (1) fezes de bovinos com dieta controle; (2) fezes de bovinos com dieta com 1,25% de TC; (3) fezes de bovinos com dieta com 2,5%TC; (4) controle sem fezes.

As fezes coletadas previamente, foram descongeladas, pesadas e misturadas (80 g) em 2 kg de solo (JOST et al., 2013), previamente coletado, analisado e peneirado. Após a mistura, o solo foi colocado em vasos de barro com capacidade de 2 kg e identificados com placas. Os vasos foram distribuídos aleatoriamente em casa de vegetação pertencente ao Laboratório de Ciências Agrárias do Departamento de Zootecnia da FZEA-USP (3.2). Durante todo o período experimental, os vasos foram irrigados duas vezes na semana. Amostras de solo foram coletadas no dia 0, após 30 e 60 dias de experimento.

Tabela 3.1 - Análise de fertilidade do solo utilizado no experimento na camada de 0-20 cm.

pH	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	M.O.	C.T.	B	Cu	Fe	Mn	Zn
CaCl2	mg.dm ⁻³ (ppm)													
5,3	11	7	0,8	22	7	0,40	21	20	11,6	0,33	7,2	22	59,9	1,1

Extratores: pH - CaCl2; P,K,Ca e Mg – Resina; Al - KCl 1M; S - Fosfato de cálcio; B - Agua Quente; Micro – DTPA; Textura – Pipeta.

Figura 3.2 - Distribuição dos tratamentos na casa de vegetação

Fonte: Própria autoria.

3.2.3 Quantificações microbiológicas

3.2.3.1 Extração de DNA

O DNA das amostras de solo foram extraídos em 500 mg utilizando do kit FastDNA® SPIN Kit for Soil. Após a extração, a qualidade e a quantidade de DNA extraído foi determinada em espectrofotômetro (DeNovix, Wilmington, EUA).

3.2.3.2 PCR em tempo real

Quantificação absoluta de PCR em tempo real (qPCR) foi realizada para estimar o número de bactérias totais, *α-Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes* nas amostras de solo. Os pares de *primers* utilizados para as reações de quantificação estão descritos na Tabela 3.2. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi calculada por uma série de seis diluições em duplicata (de 50 a 1,56 ng de DNA) a partir de três amostras selecionadas aleatoriamente. Os valores de CT

(*Cycle thresholds*) foram determinados e plotados contra o logaritmo de cada concentração de DNA para obter a curva padrão. Os valores de CT foram submetidos a regressão linear e depois calculados o valor da inclinação das curvas padrão para determinar a eficiência de amplificação utilizando a equação $E = (10^{-1/\text{slope}-1}) \times 100$. Todos os pares de *primers* apresentaram eficiências de amplificação entre 90 e 110%, considerado aceitável.

Para a quantificação da concentração de DNA bacteriano das amostras do solo, foi realizada uma curva padrão com diluições de 10 vezes (de 5×10^{-2} a 5×10^{-7} ng de DNA) de produto de PCR convencional amplificado com os mesmos *primers* usado para qPCR e purificado de acordo com metodologia descrita por Dhanasekaran et al. (2010). As reações para cada par de *primer* foram realizadas utilizando volume final de 25 μ L contendo 50 ng de DNA, 0,3 nM de cada primer, 12,5 μ L de DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, Mansfield, EUA) e água ultra-pura MilliQ em sistema de PCR ProFlex® 3 x 32-well (Applied Biosystems, Foster City, EUA). O programa de PCR consistiu em 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72 °C durante 30 segundos. As amplificações foram então purificadas utilizando o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, EUA) e imediatamente utilizados para as curvas padrão. Cada curva padrão foi realizada três vezes de forma independente e produziu resultados muito similares, o que garantiu a confiabilidade dos padrões.

Todas as reações de qPCR foram realizadas em duplicata utilizando o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, EUA) em um volume final de 10 μ L contendo 15 ng de DNA, 500 nM de cada *primer*, 5 μ L de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA) e água ultra-pura MilliQ. Um controle negativo foi realizado em cada placa para detectar possíveis contaminantes ou a formação de dímeros de *primer*. As condições de ciclagem foram desnaturação inicial de 94°C por 10 segundos seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, e 60°C durante 1 minuto para anelamento e extensão. Imediatamente após a amplificação, uma curva de melting foi realizada aumentando a temperatura a uma velocidade de 0,5°C a cada 30 segundos de 55 a 95°C. A quantificação de todas as bactérias foi realizada na mesma placa para cada

amostra. O DNA em ng foi convertido em número de cópias de DNA utilizando os métodos descritos por Godornes et al. (2007) com a seguinte equação:

$$\text{Número de cópias} = \frac{6,022 \times 10^{23} \text{ (moléculas/mole)} \times \text{massa DNA (ng)}}{\text{Número de pares de bases} \times 660 \text{ Daltons}}$$

Tabela 3.2 Primers usados na qPCR

<i>Espécies alvo</i>	<i>Forward primer</i>	<i>Reverse primer</i>	<i>pb</i>	<i>Referência</i>
Bactéria total	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG (338)	ATT ACC GCG GCT GCT GG (518)	200	Fierer et al. (2005)
<i>α-Proteobacteria</i>	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG (338)	TCT ACG RAT TTC ACC YCT AC (685)	365	Fierer et al. (2005)
<i>Actinobacteria</i>	CGC GGC CTA TCA GCT TGT TG (235)	ATT ACC GCG GCT GCT GG (518)	300	Fierer et al. (2005)
<i>Firmicutes</i>	GCA GTA GGG AAT CTT CCG (353)	ATT ACC GCG GCT GCT GG (518)	180	Fierer et al. (2005)

3.2.4 Análise Estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os procedimentos estatísticos foram obtidos com auxílio do programa SAS 9.2. O teste de média utilizado foi o teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O modelo estatístico utilizado para a composição química das fezes foi:

$$Y_{ijk} = \mu + I_j + C_k + t_i + e_{ijk}$$

onde Y_{ijk} é a variável dependente; μ = média geral; I_j = efeito do período j ; C_k = efeito de animal k ; t_i = efeito do tratamento i ; e e_{ijk} = erro aleatório ijk .

O modelo estatístico utilizado para a avaliação dos dejetos sobre a microbiota do solo foi:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (ab)_{ij} + e_{ij}$$

onde: μ = média geral ij ; α_i = efeito do nível i do fator fezes; β_j = efeito do nível j do fator tempo de incubação; e_{ij} = erro aleatório ij .

3.3 RESULTADOS

Os TC aumentaram a quantidade de matéria orgânica, FDN, FDA, lignina e N nas fezes (Tabela 3.3). Os animais suplementados com taninos excretaram menores quantidades de EE nas fezes. As análises de qPCR mostraram que os taninos presente nas fezes bovinas aumentaram a quantidade total de bactéria no solo (Figura 3.3). No dia 0 e após 30 dias de incubação, o solo que recebeu as fezes proveniente da dieta com 1,25% de TC apresentou a maior quantidade de bactérias. Já o solo que não recebeu fezes apresentou menor concentração de bactérias durante todo o período avaliado. Após 60 dias, o número total de bactérias no solo foi maior para o tratamento com as fezes dos animais que consumiram dieta com 2,5% de TC. Na comparação entre os diferentes tempos de incubação (Figura 3.4), o solo com o tratamento com 1,25% de TC aumentou o número total de bactérias aos 60 dias de incubação. Os outros tratamentos não apresentaram diferenças no número total de bactérias entre os diferentes dias de incubação.

Tabela 3.3 - Composição química das fezes dos bovinos utilizadas

<i>Componentes</i>	<i>Dietas (%TC)</i>		
	Controle	1,25	2,5
<i>MS (%)</i>	17,79 ^a	16,59 ^a	17,64 ^a
<i>MO (%)</i>	13,52 ^{ab}	13,21 ^b	14,64 ^a
<i>FDN (%)</i>	59,60 ^b	61,94 ^a	60,75 ^{ab}
<i>FDA (%)</i>	45,54 ^b	49,04 ^a	50,66 ^a
<i>Lignina (%)</i>	24,52 ^b	29,46 ^a	30,36 ^a
<i>EE (%)</i>	0,78 ^a	0,51 ^b	0,48 ^b
<i>N (%)</i>	1,78 ^b	1,93 ^a	2,02 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de média Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 3.3 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre o número total de bactérias no solo

Figura 3.4 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre o número total de bactérias no solo aos 0, 30 e 60 dias de incubação

Na Figura 3.5, estão presentes as concentrações da classe *α -Proteobacteria* do filo *Proteobacteria* nos solos avaliados. No início do experimento, as concentrações de *α -Proteobacteria* no solo foram baixas em todos os tratamentos.

Após 30 dias, o solo que recebeu fezes de bovinos alimentados com 1,25% de TC apresentou elevadas quantidades de *α-Proteobacteria* comparado com os outros tratamentos. Com 60 dias de incubação, as concentrações de *α-Proteobacteria* no solo com tanino suplementado a 1,25% reduziram muito, no entanto, este ainda apresentou valores maiores que o tratamento sem fezes. O número de *α-Proteobacteria* sofreu alterações durante os dias de incubação (Figura 3.6). No solo com tratamento controle o número de *α-Proteobacteria* aumentou aos 60 dias de incubação. Um aumento significativo de *α-Proteobacteria* foi observado no solo com fezes contendo 1,25% de TC aos 30 dias de incubação, no entanto, após 60 dias houve uma redução no número destes microrganismos no solo.

Figura 3.5 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre a classe de *α-Proteobacteria* no solo

Figura 3.6 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre a classe de α -*Proteobacteria* no solo aos 0, 30 e 60 dias de incubação

O presente estudo mostrou que os taninos também alteram as concentrações do filo *Actinobacteria* do solo (Figura 3.7). Assim como a classe α -*Proteobacteria*, aos 30 dias de experimento, o valores de *Actinobacteria* para o tratamento com fezes advindo de dieta com 1,25% de TC aumentaram significativamente em comparação com o tratamento sem TC e sem fezes. Com 60 dias, a adição de fezes com maiores concentrações de tanino resultou em um aumento nos valores de *Actinobacteria*. As fezes provenientes da dieta controle também ocasionaram leve aumento neste filo, no entanto, ao contrário, uma drástica redução no solo com o tratamento de 1,25% de TC foi observada. As concentrações de *Actinobacteria* foram alteradas durante os diferentes tempos de incubação com a adição de fezes bovinas (Figura 3.8). Tanto no tratamento controle quanto no tratamento com 2,5% de TC, as quantidades de *Actinobacteria* elevaram com 60 dias de incubação. Já para o tratamento com 1,25% de TC, houve uma diminuição na concentração deste filo aos 60 dias de incubação em comparação com a quantidade observada aos 30 dias.

Figura 3.7 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre o filo *Actinobacteria* no solo

Figura 3.8 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre o filo *Actinobacteria* no solo aos 0, 30 e 60 dias de incubação

No início do experimento, a adição de 1,25% de TC na dieta resultou em maiores valores de *Firmicutes* no solo comparado ao tratamento sem fezes (Figura 3.9). Após 30 dias, quantificações elevadas deste filo também foram observadas para as fezes com taninos suplementados a 1,25% na dieta. No entanto, aos 60 dias de incubação não foi observada diferença entre os tratamentos. Na comparação

entre o tempo de incubação, no solo com tratamento de 1,25% de TC a população de Firmicutes foi significativamente menor aos 60 dias de incubação em comparação ao tempo de 0 e 30 dias (3.10).

Figura 3.9 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre o filo *Firmicutes* no solo

Figura 3.10 - Efeito dos taninos presente em fezes bovinas sobre o filo *Firmicutes* no solo aos 0, 30 e 60 dias de incubação

3.4 DISCUSSÃO

O estudo demonstrou que a dieta com taninos disponibilizou maior aporte de C e N via fezes para o solo. Os TC aumentaram a quantidade de matéria orgânica, FDN, FDA, lignina e N nas fezes. As maiores concentrações destes componentes químicos nas fezes bovinas em regime alimentar com taninos indica interferência destes na degradação da celulose e proteína dietética pela microbiota do rúmen. A redução da degradação da proteína e celulose no rúmen pode ocorrer em decorrência da aderência destes componentes aos TC impedindo sua degradação pelas bactérias (PATRA; SAXENA, 2011). A maior excreção de nitrogênio fecal tem sido relatada em muitos estudos em dietas com taninos para ruminantes (ANIMUT et al., 2008; GRAINGER et al., 2009) indicando que os complexos tanino-proteína não foram completamente dissociados no abomaso e no intestino (PATRA; SAXENA, 2011).

O manejo animal afeta indiretamente a ciclagem do nitrogênio. O aumento na excreção do nitrogênio fecal é benéfico para o meio ambiente, pois este é eliminado na forma orgânica, que é menos volátil, enquanto que o nitrogênio urinário, eliminado em grande parte na forma de ureia, é mais rapidamente hidrolisado em amônia e nitrito para nitrato (ECKARD et al., 2010). Assim, a diminuição da excreção de nitrogênio na urina pode reduzir as emissões de amônia e óxido nitroso para a atmosfera (PATRA; SAXENA, 2011), e aumentar a disponibilidade do nitrogênio em forma orgânica para a mineralização e consequente absorção de plantas.

As maiores quantidades de microrganismos observada nos tratamentos com as fezes bovinas em comparação ao tratamento sem inclusão de fezes no dia 0 de incubação reflete a contabilização dos microrganismos das fezes nas amostras, pois o material fecal foi bem misturado ao solo antes do início da inclusão nos vasos.

A adição de taninos na alimentação dos bovinos afetou não só a microbiota do solo, como provavelmente também afetou a população dos microrganismos nas fezes dos animais. Isso explica os maiores valores do filo *Actinobacteria* no tratamento com 1,25% de TC no início da incubação. Para corroborar esta afirmação, alterações no perfil dos microrganismos em fezes de cabras consumindo dietas com inclusões de TC também foi observada por Min et al. (2014). No entanto,

os autores verificaram aumento em espécies pertencente ao filo *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Contrariamente, Huang et al. (2017), não encontrou diferença nos microrganismos em fezes de cordeiros consumindo leguminosa taninífera. É importante ressaltarmos que as mudanças microbianas causada pelos TC vão depender de sua reatividade, e como o último é fortemente associado a sua estrutura química, espera-se que os efeitos sobre o microbioma fecal e do solo variem amplamente. Os TC do extrato de acácia utilizado em nosso estudo possui uma alta reatividade biológica confirmada em prévios estudos (BUENO et al., 2008; BUENO et al., 2015).

Aos 60 dias de incubação, a adição de 2,5% de TC na dieta dos animais resultou em aumentos significativos no número total de bactérias do solo, sendo este maior que o tratamento sem fezes. Nos tratamentos controle e 1,25% de taninos ocorreu o oposto, estes apresentaram número de bactérias mais elevados que o tratamento sem fezes aos 30 dias de incubação. O aumento de bactérias no solo com a adição dos tratamentos controle e 1,25% TC, se deve ao enriquecimento do solo com matéria orgânica pela adição das fezes, e, os menores valores verificados aos 60 dias possa indicar uma estabilização na atividade microbiana do solo em consequência do menor aporte de nutrientes. Em concordância, Jost et al. (2013) verificaram aumentos na biomassa microbiana nos solos incubados com fezes bovinas em relação ao solo sem a adição de fezes.

No entanto, os maiores valores no número total de bactérias no solo para o tratamento de 2,5% de TC, indicam que em concentrações mais elevadas na dieta e consequentemente também nas fezes, estes foram capazes de diminuir a velocidade de decomposição do solo, provavelmente em decorrência da formação do complexo tanino-proteína ou com outras macromoléculas como a lignina. Segundo Kraus et al. (2003), uma vez que os taninos entram no solo, podem permanecer em solução, precipitar, adsorver as partículas do solo, formar complexos com proteínas ou metais, serem transformados de forma biológica ou abiótica, ou serem degradados pelos organismos do solo. A influência dos taninos sobre a taxa de degradação do solo foi relatada por alguns estudos na literatura (KARBULTJI et al., 1999; DRIEBE; WHITHAM, 2000; KRAUS et al., 2003; KRAUS et al., 2004; WINDER et al., 2013).

Aos 30 dias de incubação, o tratamento com as fezes dos animais consumindo dieta com 1,25% de TC aumentaram amplamente a presença de bactérias pertencente a classe α -*Proteobacteria* no solo em comparação aos outros tratamentos, seguida de uma queda na concentração aos 60 dias. O filo *Proteobacteria* é o mais diverso e abundante no solo, e a classe α -*Proteobacteria* é onde estão presente os grupos de importância nos ciclos do carbono e nitrogênio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, nós atribuímos o aumento neste grupo de bactérias no solo com a adição de fezes proveniente de dieta com 1,25% de TC aos maiores valores de N e celulose como substrato para decomposição em comparação as fezes da dieta controle. E possivelmente, as fezes de animais com menores adições de TC apresentaram grau menor de complexação com a proteína e a fibra do que ao nível de 2,5% de suplementação na dieta. Winder et al. (2013) observaram aumento na quantidade de microrganismos da classe β -*Proteobacteria* em solos incubados com resíduos de folhas com alto teor de taninos. Goldfarb et al. (2011) verificaram que o crescimento das classes β -*Proteobacteria* e γ -*Proteobacteria* no solo foram estimulados em presença do substrato tanino-proteína. Os mesmos autores também observaram um táxon da classe γ -*Proteobacteria* na qual seu crescimento foi estimulado somente em presença dos taninos. Em concordância ao mencionado, estirpes bacterianas do gênero *Klebsiella* sp. pertencente a classe γ -*Proteobacteria* do filo *Proteobacteria* capazes de utilizar o ácido tânico como única fonte de carbono e energia foram isoladas em fezes de cabras consumindo dietas ricas em taninos (TAHMOURESPOUR et al., 2016).

As análises moleculares mostraram que o crescimento de microrganismos pertencente ao filo *Actinobacteria* também foram estimulados em presença dos taninos. Os valores para estes microrganismos foram maiores no solo com a adição de fezes proveniente de dietas com 1,25% aos 30 dias de incubação; no entanto, com o aumento no tempo de incubação (60 dias), o crescimento deste filo foi significativamente estimulado no solo com a inclusão do tratamento com 2,5% de TC.

Esse comportamento possivelmente reflete o efeito dos TC nas fezes com maiores concentrações de taninos (2,5%) sobre a taxa de decomposição do solo mencionada anteriormente. As actinobactérias produzem enzimas extracelulares

que degradam macromoléculas como a celulose e lignina no solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, as elevadas concentrações destes microrganismos observada somente aos 60 dias de incubação no tratamento com 2,5% de suplementação de TC, são consequência tanto no atraso na taxa de decomposição pelos taninos, como também ao maior aporte de celulose e lignina verificada nas fezes deste regime alimentar. Entretanto, com 1,25% de suplementação ocorreu o contrário, pois a degradação do maior aporte de celulose e lignina presente neste tratamento supostamente não foram afetadas pelos taninos.

No presente estudo, os TC ao nível de 1,25% na dieta favoreceram a população de bactérias do filo *Firmicutes* no solo aos 30 dias de incubação, no entanto tal abundância não se manteve aos 60 dias. Para tal fato, acreditamos que possa ser consequência dos altos valores deste filo presente na matéria fecal dos animais sob esse regime alimentar, tendo sido esses beneficiados temporariamente pela supressão de outros microrganismos ocasionada pela atividade antimicrobiana dos TC. Na literatura, não há relatos do aumento no número de *Firmicutes* no solo em decorrência dos taninos. Existindo apenas evidências sobre o maior crescimento destes na microbiota de fezes (MIN et al., 2014).

3.5 CONCLUSÕES

O estudo demonstrou que os taninos causaram alterações na composição química das fezes e retardou a taxa de decomposição dos nutrientes do solo. As concentrações de alguns dos principais filos de bactérias do solo também foram alteradas. As fezes com taninos além de terem aumentado a quantidade de bactérias totais no solo, ocasionaram acréscimo nos filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Firmicutes*.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANIMUT, G.; GOETSCH, A.L.; PUCHALA, R.; PATRA, A.K.; SAHLU, T.; VAREL, V.H.; WELLS, J. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from *lespedeza*. **Animal Feed Science and Technology**, v.144, p.212–227, 2008.

BUENO, I.C.S.; BRANDI, R.A.; FRANZOLIN, R.; FAGUNDES, G.M.; BENETEL, G.; ABDALLA, A.L.; LOUVANDINI, H.; MUIR, J. P. Comparative *in vitro* methane production and antimethanogenic effect of tannins in five ruminant species. **Animal Feed Science and Technology**, v. 205, p.1-9, 2015.

BUENO, I.C.S.; VITTI, D.M.S.S.; LOUVANDINI, H.; ABDALLA, A.L. A new approach for *in vitro* bioassay to measure tannin biological effects based on a gas production technique. **Animal Feed Science and Technology**, v. 141, p. 153-170, 2008.

DHANASEKARAN, S.; DOHERTY, T.M.; KENNETH, J. Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. **Journal of Immunology Methods**. v.354, p.34–39, 2010.

DRIEBE, E.M.; WHITHAM, T.G. Cotton wood hybridization affects tannin and nitrogen content of leaf litter and alters decomposition. **Oecologia**, v.123, p.99–107, 2000.

ECKARD, R.J.; GRAINGER, C.; KLEIN, C.A.M.; Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production. **Livestock Science**, v.130, p.47–56, 2010.

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and environmental microbiology**, v.71, p.4117-4120, 2005.

GODORNES, C.; LEADER, B.T.; MOLINI, B.J.; CENTURION-LARA, A.; LUKEHART, S.A. Quantitation of rabbit cytokine mRNA by real-time RT-PCR. **Cytokine**. V.38, p.1, 2007.

GOLDFARB, K. C.; KARAOZ, U.; HANDSON, C.A.; SANTEE, C.A.; BRADFORD, M.A.; TRESEDER, K.K.; WALLENSTEIN, M.D.; BRODIE, E.L. Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p.94, 2011.

GRAINGER, C.; CLARKE, T.; AULDIST, M.J.; BEAUCHEMIN, K.A.; MCGINN, S.M.; WAGHORN, G.C.; ECKARD, R.J. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 89, p.241–251, 2009.

HUANG, Q.; HOLMAN, D.B.; ALEXANDER, T.; HU, T.; JIN, L.; XU, Z.; MCALLISTER, T.A.; ACHARYA, S.; ZHAO, G.; WANG, Y. Fecal microbiota of lambs fed purple prairie clover (*Dalea purpurea* Vent.) and alfalfa (*Medicago sativa*). **Archives of Microbiology**, p. 1-9, 2017.

JOST, D. I.; JOERGENSEN, R. G.; SUNDRUM, A. Effect of cattle faeces with different microbial biomass content on soil properties, gaseous emissions and plant growth. **Biology and fertility of soils**, v. 49, p. 61-70, 2013.

KALBURTJI, K. L.; MOSJIDIS, J. A.; MAMOLOS, A. P. Litter dynamics of low and high tannin *Sericea lespedeza* plants under field conditions. **Plant Soil**, v. 208, p.217–281, 1999.

KRAUS, T.E.C.; ZASOSKI, R.J., DAHLGREN, R.A.; HORWATH, W.R.; PRESTON C.M. Carbon and nitrogen dynamics in a forest soil amended with purified tannins from different plant species. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 309–321, 2004.

KRAUS, T.E.C.; DAHLGREN, R.A.; ZOSOZKI, R.J. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystems—a review. **Plant Soil**, v.256, p.41–66, 2003.

MIN, B.R.; SOLAIMAN, S.; SANGE, R.; EUN, J.S. Gastrointestinal bacterial and Methanogenic archaea diversity dynamics associated with condensed tannins-containing pine bark diet in goats using 16S rDNA amplicon pyrosequencing. **International Journal of Microbiology**, v 4, p.1–11, 2014.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MUIR, J. P. The multi-faceted role of condensed tannins in the goat ecosystem. **Small Ruminant Research**, v. 98, p.115–120, 2011.

PATRA, A. K.; SAXENA, J. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, p.24-37, 2011.

TAHMOURESPOUR, A.; TABATABAEE, N.; KHALKHALI, H.; AMINI, I. Tannic acid degradation by *Klebsiella* strains isolated from goat feces. **Iranian journal of microbiology**, v.8, p.14, 2016.

TERRILL, T. H.; WAGHORN, G. C.; WOOLLEY, D. J.; MCNABB, W. C.; BARRY, T. N. Assay and digestion of 14 C-labelled condensed tannins in the gastrointestinal tract of sheep. **British Journal of Nutrition**, v.72, p.467-477, 1994.

WINDER, R. S.; LAMARCHE, J.; CONSTABEL, C.P.; HAMELIN, R.C. The effects of high-tannin leaf litter from transgenic poplars on microbial communities in microcosm soils. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 290, 2013.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O nosso estudo indicou que várias atividades antimicrobianas dos taninos sobre o ecossistema ruminal ainda precisam ser esclarecidas, pois, tais efeitos parecem-nos mais complexos do que supúnhamos ser. Além disso, efeitos dos taninos variam de uma espécie de leguminosa para outra, de modo que o que aprendemos com uma não se aplica necessariamente a outra. Assim, espera-se, que pesquisas futuras aliadas as técnicas moleculares, possam encontrar mais esclarecimentos dos mecanismos de ação dos TC sobre o microbioma rúmen, possibilitando respostas a conflitantes questões sobre metanogênese, degradabilidade e valor nutricional. Sugere-se, diante disso, que estudos futuros, invistam em pesquisas de mapeamento dos principais monômeros constituintes dos compostos secundários destas plantas, e juntamente com isso, avaliem seus efeitos, como aditivo, na dieta de ruminantes.

Quase a totalidade das pesquisas para a mitigação de metano em ruminantes não considera o sistema de produção animal como parte de um todo. Há de se pensar que a investigação de alternativas nutricionais para este propósito deve levar em consideração o impacto dos resíduos desta estratégia em todo o ciclo de produção. Esperamos que futuras investigações sobre as atividades antimicrobianas dos TC sobre o ecossistema ruminal revelem as vias metabólicas envolvidas em tão complexo processo. Por exemplo, quais são as vias inibitórias envolvidas no crescimento das arqueias? Será que todos os grupos filogenéticos das arqueias ruminais são afetados? Quais são os outros grupos bacterianos que também são afetados?