UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LERNER ARÉVALO PINEDO

Teores de taninos e produção de gases *in vitro* da silagem de sorgo com adição de níveis crescentes de guandu

Piracicaba
2009

LERNER ARÉVALO PINEDO

Teores de taninos e produção de gases *in vitro* da silagem de sorgo com adição de níveis crescentes de guandu

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

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

Piracicaba
2009

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

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

Pinedo, Lerner Arévalo
Teores de taninos e produção de gases *in vitro* da silagem de sorgo com adição de níveis crescentes de guandu / Lerner Arévalo Pinedo; orientador Adibe Luiz Abdalla. - - Piracicaba, 2009.
80 p.: fig.

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

1. Alimentos volumosos 2. Digestibilidade 3. Metano 4. Nutrição animal 5. Ovinos 6. Plantas forrageiras I. Título

CDU 633.87:547.211

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial a meus filhos, Lucas, Bianca Raquel e Mariana Cristina, cujas faces refletem continuamente nossa vontade de seguir em frente.

Aos meus pais Hernán e Auristela, que me forneceram os primórdios da minha formação acadêmica.

Aos meus irmãos, Gledys, Clever, Aroldo, Rosalinda e Linder, pela grande amizade e confiança que sempre tiveram em mim.

À minha esposa Marta Cristina por todas coisas que você fez e tem feito por mim. As lembranças, o carinho e todo amor que você demonstra. Você é muito especial pra mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus
Pela minha existência e por tudo que Ele tem me proporcionado.

A meu Orientador
Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla pela paciência e orientação na realização deste trabalho, que auxiliou no meu desenvolvimento profissional e realização desse trabalho.

Ao CENA/USP
Centro de Energia Nuclear na Agricultura, por conceder-me a oportunidade da realização do Doutorado.

Aos Funcionários
A todos os funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Regina, Lécio, Everaldo e funcionários do CENA, Neuda, Sonia e Claudia pela atenção dispensada desde os primeiros dias da realização do Curso de Doutorado.

Aos Acadêmicos
A todos os estudantes do Laboratório de Nutrição Animal: Tanimara, Alcester, Fernanda, Patrícia, Bernardo, Amr, Yosra, Ronaldo, e aos que fizeram presentes no decorrer do Doutorado.

À CAPES
Pela bolsa de Doutorado concedida.

Aos Professores
Profa. Dr. Dorinha Vitti, meu muito obrigado pelos conselhos e sugestões durante a minha Qualificação de Doutorado; aos Professores. Dr. Gerson Barreto Mourão, Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues e Dr. José Aparecido Moreira, meu muito obrigado pelo auxílio na análise estatística e ao Prof. Dr. Ives Cláudio Bueno, no auxílio das análises de produção de gases.

À Bibiotecária
Srta. Marília R. G. Henyei, pela paciência na revisão dos trabalhos e apoio bibliotecário.

Aos meus familiares
Aroldo, Rosalinda, Linder, Clever e Gledys que, mesmo distantes, são fundamentais na minha vida.

“A vida não é um corredor reto e tranquilo que
nós percorremos livres e sem empecilhos,
mas um labirinto de passagens,
pelas quais nós devemos procurar o nosso
objetivo, perdidos e confusos, de vez em quando
presos em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé, no Deus dos Deuses
uma porta sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual
nós mesmos nunca pensamos,
mas aquela que definitivamente
se revelar· boa para nós”.

Anônimo

RESUMO

PINEDO, L. A. **Teores de taninos e produção de gases *in vitro* da silagem de sorgo com adição de níveis crescentes de guandu**. 2009. 80 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Na alimentação animal, o sorgo pode ser explorado de diversas formas. Além dos grãos, a planta pode ser oferecida na forma de silagem, rolão, verde ou ainda pastejada; embora o valor nutritivo pode sofrer algumas variações pela presença ou ausência de compostos fenólicos como os taninos condensados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química-bromatológica, qualidade fermentativa e produção de gases *in vitro* nas silagens de sorgo granífero adicionados com diferentes níveis de guandu. O estudo foi dividido em dois experimentos. O primeiro estudo (Capítulo 3) avaliou os efeitos da adição de forragem de guandu sobre a composição química-bromatológica e fermentativas da silagem de sorgo granífero. Os tratamentos foram compostos por: T1 - Silagem com 100% de sorgo, T2 - Silagem com 25% de guandu e 75% de sorgo, T3 - Silagem com 50% de guandu e 50% de sorgo, T4 - Silagem com 75% de guandu e 25% de sorgo e T5 - Silagem com 100% de guandu. As variáveis estudadas para a composição química e fermentativas das silagens foram: matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro (FDA), carboidratos totais (CHOT), matéria mineral (MM), fenóis totais (FT), taninos totais (TT), taninos condensados (TC), pH, capacidade tampão (CT), perdas fermentativas e ácido lático. A adição de guandu promoveu efeito linear ($P<0,01$) nas silagens para os teores de MS, PB, FDN, FDA, FT, assim como para as perdas fermentativas de MS da silagem. Enquanto para os teores de CHOT, MM e TC verificaram-se respostas quadráticas ($p<0,01$) entre as silagens. Inclusões de 25, 50 e 75% de guandu, com base na matéria fresca, seriam suficientes para melhorar o valor nutricional assim como para se obter melhor padrão fermentativo da silagem de sorgo. O segundo estudo (Capítulo 4) avaliou a produção total de gases, metano, degradabilidade da MS (DMS) e degradabilidade da MO (DMO) em silagens de sorgo granífero com níveis crescentes de guandu através da técnica *in vitro* de produção de gases. Foram avaliadas as cinco silagens de sorgo granífero com níveis crescentes (0, 25, 50, 75 e 100%) de guandu utilizados como substratos. Para avaliar o efeito do tanino nas silagens sobre a produção de gases, procedeu-se um bioensaio, no qual os substratos foram incubados na presença de polietileno glicol (PEG), macro molécula capaz de ligar-se aos taninos presente no substrato, liberando os nutrientes para a fermentação; sendo o efeito do tanino medido pelo incremento na produção de gases. Não houve diferença estatística para a produção total de gases e metano para os níveis de inclusão do guandu, entretanto houve diferença significativa para o contraste nível zero e a inclusão do guandu. Para os incrementos também não houve diferença significativa para as variáveis (PG, CH_4, DMS e DMO). Por outro lado, houve maior PG e maior incremento para o nível de 25% de guandu com a presença do PEG. Foi encontrado maior emissão de metano e incremento de metano para o nível 50% de guandu, quando comparado com os demais níveis. Houve maior DMS e DMO no substrato com 100% de guandu com a presença do

PEG. Concluiu-se que a adição de forragem de guandu na silagem de sorgo aumentou o conteúdo de PB e reduziu os teores de FDN, implicando um melhor valor nutritivo das silagens, contudo os taninos condensados precisariam ser monitorados para futuros experimentos *in vivo*.

Palavras-chave: Silagem, sorgo, guandu, taninos, produção de gases.

ABSTRACT

PINEDO, L. A. **Tannins Levels and gas production *in vitro* of sorghum silage with the addition of increasing levels of pigeon pea**. 2009. 80 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

In animal nutrition, sorghum can be used in various ways. Besides grain, the plant can be offered as silage, pollard, green or even grazed. Although the nutritional value may undergo some changes by the presence or absence of phenolic compounds such as condensed tannins. The objective of this study was to evaluate the chemical composition, fermentation quality and gas production *in vitro* in sorghum silage added with different levels of pigeon pea. The study was divided into two experiments. The first study (Chapter 3) evaluated the effects of the addition of pigeon pea grass on the chemical composition and fermentation of sorghum silage. The treatments were: T1 - silage with 100% sorghum, T2 - silage with 25% of pigeon pea and sorghum 75%, T3 - silage with 50% of pigeon pea and sorghum 50%, T4 - silage with 75% pigeon pea and 25% of sorghum and T5 - silage with 100% pigeon pea. The parameters of chemical composition and fermentation of the silage were: dry matter (DM), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), total carbohydrates (TCHO), ash, total phenolics (TP), total tannins (TT), condensed tannins (CT), pH, buffer capacity (BC), losses of fermentation and lactic acid. The addition of pigeon pea showed linear effect ($P < 0.01$) in silage for DM, CP, NDF, ADF, TP, as well as the levels of CT and fermentation losses in DM of silage. As for the contents of TCHO, CT and MM there were quadratic responses ($p < 0.01$) among silages. The results observed that, inclusion of 25, 50 and 75% pigeon pea, based on fresh weight, are sufficient to improve the nutritional value and to achieve better fermentation pattern of sorghum silage. The second study (Chapter 4) evaluated the production of gases, methane, DM degradability and degradability of OM in silage sorghum with increasing levels of pigeon pea using the technique of bioassay gas production. Five types of grain sorghum silage with increasing levels (0, 25, 50, 75 and 100%) of pigeon pea were used as substrates and evaluated by gas production technique. There were no significant differences with and without the presence of PEG within each level using regression, for (GP, CH_4 and DMD), but there were significant effect for using of contrast for the variables (GP, CH_4 and OMD). No significant difference was observed for the increments for the variables (GP and CH_4,). On the other hand GP was more increase in the level of 25% of pigeon pea in the presence of PEG. Compared with the other levels of pigeon pea the level 50% showed higher emissions of methane. In the presence of PEG,DMD and OMD Showed higher percentage on the substrate with 100% of pigeon pea . it can be concluded that ,the addition of pigeon pea in sorghum silage increased the PC content and decreased the NDF, implying a higher nutritive value of silages, but the tannins need to be monitored for future experiments *in vivo*.

Keywords: silage, sorghum, pigeon pea, tannins, gas production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de taninos condensados..... 23

Figura 2. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de matéria seca (g/kg matéria fresca) da silagem de sorgo..... 43

Figura 3. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de proteína bruta (g/kg MS) da silagem de sorgo..... 44

Figura 4. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de fibra em detergente neutro (g/kg MS) da silagem de sorgo..... 45

Figura 5. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de fibra em detergente ácido (g/kg MS) da silagem de sorgo..... 46

Figura 6. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de carboidratos totais (g/kg MS) da silagem de sorgo..... 46

Figura 7. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de matéria mineral (g/kg MS) da silagem de sorgo..... 47

Figura 8. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de fenóis totais (eq-g de ácido tânico/kg MS) da silagem de sorgo..... 48

Figura 9. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de taninos totais (eq-g de ácido tânico/kg MS) da silagem de sorgo..... 48

Figura 10. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de taninos condensados (eq-g de leucocianidina/kg MS) da silagem de sorgo..... 49

Figura 11. Efeito de níveis de inclusão de guandu no pH da silagem de sorgo..... 50

Figura 12. Efeito de níveis de inclusão de guandu na capacidade tampão (meq/100 g MS de forragem) da silagem de sorgo..... 51

Figura 13. Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de ácido lático (% MS) da silagem de sorgo..... 52

Figura 14. Efeito de níveis de inclusão de guandu nas perdas fermentativas (g/kg matéria fresca) da silagem de sorgo..... 53

Figura 15. Representação gráfica da equação de regressão para o resultados do contraste da produção de gases sem e com a presença do PEG (mL/g MS) nos substratos incubados..... 64

Figura 16. Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da produção de CH_4 sem e com a presença do PEG (mL/g MS) dos substratos incubados..... 66

Figura 17. Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da DMO (g/kg MS) sem e com a presença do PEG nos substratos incubados..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados meteorológicos mensais do primeiro semestre (período experimental) de 2006 em Piracicaba - SP..... 32

Tabela 2. Resultados de análise química do solo (0 - 20 cm)..... 33

Tabela 3. Produções médias das plantas forrageiras estudadas destinadas ao processo de ensilagem..... 39

Tabela 4. Composição química da forragem..... 41

Tabela 5. Composição químico-bromatológica das silagens..... 42

Tabela 6. Perfil fermentativo das silagens..... 53

Tabela 7. Médias de produção de gases (PG 24h), metano (CH_4) e incrementos (%) das silagens usados como substratos na presença do PEG após 24 horas de incubação..... 65

Tabela 8. Médias de degradabilidade da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO) das silagens usados usados como substratos na presença do PEG após 24 horas de incubação..... 68

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**.....	16
2.	**REVISÃO DA LITERATURA**.....	18
2.1	Características do sorgo para ensilagem.....	18
2.2	Importância do guandu na nutrição animal.....	19
2.3	Efeito dos taninos no processo de ensilagem.....	20
2.4	Taninos na nutrição dos ruminantes.....	22
2.5	Estimativa de metano pela técnica de produção de gases *in vitro*.....	25
3	**EFEITOS DA ADIÇÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE GUANDU SOBRE AS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FERMENTATIVAS DA SILAGEM DE SORGO**.....	28
Resumo.....		28
Abstract.....		29
3.1	**INTRODUÇÃO**.....	30
3.2	**MATERIAL E MÉTODOS**.....	32
3.2.1	Localização do experimento.....	32
3.2.2	Preparo do solo e plantio das culturas.....	32
3.2.3	Preparo da ensilagem e tratamentos estudados.....	33
3.2.4	Análise química da forragem.....	34
3.2.5	Abertura dos silos experimentais.....	36
3.2.6	Análise química da silagem.....	37
3.2.7	Delineamento experimental e análise estatística.....	37
3.3	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....	39
3.3.1	Características agronômicas.....	39
3.3.2	Composição química da forragem.....	40

3.3.3 Análise da composição química-bromatológica da silagem..... 41

3.3.4 Análise do perfil fermentativo das silagens..... 49

3.4 CONCLUSÕES..... 54

4 AVALIAÇÃO DAS SILAGENS DE SORGO COM ADIÇÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE GAUNDU PELA TÉCNICA *IN VITRO* SEMI-AUTOMÁTICA DE PRODUÇÃO DE GASES..... 55

Resumo..... 55

Abstract..... 56

4.1 INTRODUÇÃO..... 57

4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... 59

4.2.1 Local do experimento..... 59

4.2.2 Tratamento e processamento das amostras..... 59

4.2.3 Bioensaio *in vitro* de produção de gases na presença de polietileno glicol (PEG)..... 59

4.2.3.1 Frascos de fermentação..... 60

4.2.3.2 Meio de cultura..... 60

4.2.3.3 Preparo do inoculo e inoculação..... 60

4.2.3.4 Medição de gases..... 61

4.2.3.5 Coleta e determinação do metano..... 62

4.2.3.6 Incremento de gás na presença do PEG (bioensaio)..... 62

4.2.3.7 Degradabilidades da matéria seca (DMS) e degradabilidade da matéria orgânica (DMO)..... 63

4.2.4 Delineamento e análise estatística..... 63

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 64

4.3.1 Bioensaio de Produção de gases..... 64

4.3.2 Degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO)..... 67

4.4 **CONCLUSSÕES**..... 70

5 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**..... 71

REFERÊNCIAS..... 72

1 INTRODUÇÃO GERAL

A baixa disponibilidade e valor nutritivo das pastagens, notadamente no período seco, são os fatores que mais contribuem para a perda de peso e diminuição de produção de leite e carne dos animais.

Na situação brasileira, é de conhecimento geral que os animais ganham peso e produzem mais leite na estação das águas, onde os capins e demais volumosos estão verdes e com elevado valor nutritivos. Entretanto, na estação da seca, os pastos estão secos, e ocorre decréscimo na digestibilidade do material em função primordialmente do acréscimo no teor de lignina, afetando de maneira significativa o desempenho dos animais mantidos a pasto (FUKUSHIMA, 2007).

A silagem de sorgo constitui um bom alimento para ser fornecido aos ruminantes, apresentando valor nutricional bem próximo ao do milho, mas com produtividade de matéria seca por hectare superior (NEUMANN et al., 2002). Apresenta ainda uma importante característica de manter vivo seu sistema radicular após a colheita para ensilagem, o que possibilita em condições adequadas de temperatura, umidade e presença de nutrientes, uma rebrota com considerável produção de matéria seca em até 60% após o primeiro corte Dias et al. (2001).

Entretanto, a silagem de sorgo, se utilizada como único volumoso, apresenta um baixo teor de proteína, o que constitui uma limitação ao seu uso para os animais (EVANGELISTA et al., 2005). Uma alternativa para melhorar o valor nutritivo da silagem, é a inclusão de forrageiras com elevado teores de proteína.

A adição de leguminosas é uma opção para proporcionar aumentos no teor de proteína bruta (PB) da silagem fornecida aos animais, além de supri-la com maior quantidade de cálcio e fósforo (DIAS, 2007). Dentre elas, o guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp) é uma das principais leguminosas cultivadas nas diferentes regiões do mundo (TANGTAWEEWIPAT; ELLIOTT, 1989), altamente palatável, produz elevadas quantidades de forragem com altos teores de proteína e minerais durante a época da seca (DAHIYA et al., 2002).

A cultivar de guandu cv. IAPAR 43 caracteriza-se por ser de porte baixo, alta palatabilidade, alto conteúdo de proteína e pode trazer bons resultados em comparação com outras cultivares, com a vantagem ainda, de possibilitar uma segunda rebrota de produção de forragem. Outros fatores importantes que justificam a utilização dessa cultivar é que oferece diversas opções, tais como pastagem

consorciada, forragem verde ou feno e, possivelmente como componente de misturas na produção de silagem e alto valor nutritivo (SANTOS et al., 2009).

Muitas plantas forrageiras usadas na alimentação de ruminantes com elevados teores de proteína podem apresentar fatores antinutricionais e/ou tóxicos, que podem interferir na biodisponibilidade e digestibilidade de alguns nutrientes. De acordo com Godoy (2007), no metabolismo dos vegetais há uma série de substâncias secundárias ou antinutricionais, como os compostos fenólicos, taninos e taninos condensados que podem diminuir o valor nutritivo das forrageiras, sendo os taninos condensados que exercem grande influência no valor nutritivo de forragens

Os taninos estão dentro deste grupo de fatores antinutricionais, que são compostos fenólicos de alto peso molecular de 500 a 3000 daltons, com capacidade suficiente de complexar proteínas e outras macromoléculas, como celulose, minerais, íons metálicos, vitaminas, e outros (AGANGA; MONASE, 2001).

Evidentemente várias pesquisas foram realizadas para melhorar a utilização das plantas taniníferas pelos ruminantes. A adição do polietileno glicol (PEG) e polivinilpoli-pirrolidona (PVPP) têm sido testados para se ligarem a estes compostos e formarem complexos semelhantes ao das proteínas e deste modo deixando-as livres de serem complexadas (GETACHEW et al., 2000). O rompimento do complexo tanino-proteína aumenta a biodisponibilidade da proteína para a microflora do rúmen o que ocasiona benefícios ao animal.

Desta forma, objetivou-se com essa pesquisa, avaliar os efeitos da adição de níveis crescentes de forragem de guandu na composição química da silagem de sorgo granífero e determinar a influência dos teores de taninos na produção de gases e de metano *in vitro* da silagem de sorgo granífero com adição de guandu.

Os resultados serão apresentados na forma de capítulos. Nos dois primeiros capítulos estão contidas a introdução geral e a revisão de literatura. O terceiro capítulo descreve os resultados da caracterização química da forragem original e da silagem de sorgo granífero adicionada com diferentes níveis de guandu, e finalmente o quarto capítulo avalia a produção de gases e produção de metano com a presença do polietileno glicol (PEG) na silagem de sorgo granífero com adição de guandu usando a técnica semi-automática de produção de gases *in vitro* após 24 horas de incubação. Adicionalmente foi avaliado a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características do sorgo para ensilagem

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é o quinto cereal mais produzido no mundo, ficando atrás do milho, trigo, arroz e cevada. A cultura de sorgo contribui com 10 a 12% da área total cultivada para silagem no Brasil e se destaca, de modo geral, por apresentar produtividade de matéria seca (ton MS/ha/ano) mais elevada que a do milho, principalmente em condições de cultivo em solos de baixa fertilidade natural e em locais onde é freqüente a ocorrência de estiagens longas (ROCHA JÚNIOR et al., 2000). Assim, o sorgo pode ser utilizado nas rações de monogástricos e ruminantes, podendo ser fornecido na forma direta de grãos como ingrediente na ração, corte verde em cochos e pastejo ou conservados na forma de feno e silagem (POMPEU, 2003).

Segundo Souza et al. (2003) existem três características principais que interferem no processo de ensilagem: teor de umidade, capacidade tamponante e teor de carboidratos solúveis totais. Esses fatores podem afetar negativamente o processo fermentativo, impedindo o rápido decréscimo do pH pela alta capacidade tamponante ou pela própria falta de substratos fermentescíveis para que haja fermentação láctica.

De acordo com Oliveira et al. (2005), no sorgo granífero a proporção de grãos é um importante fator determinante da qualidade das silagens, pois nele encontra-se a maior fração energética disponível da planta, sendo eles responsáveis pela maior elevação no teor de matéria seca das forrageiras. Os mesmos autores obtiveram produções de matéria natural em dois híbridos de sorgo granífero (BR 700 e CMS 762) de 45,8 e 59,9 respectivamente. De acordo com Restle et al. (2002), a produtividade mínima aceitável para o sorgo é de 40 toneladas de massa verde por hectare, pois, abaixo disto, é economicamente inviável para o produtor.

Um importante fator determinante do tipo de fermentação no processo de ensilagem é o teor de matéria seca da planta. Nos sorgos este teor varia com a idade de corte e com a natureza do colmo da planta (CARVALHO et al., 1992).

Segundo Flaresso et al. (2000), para otimizar a produtividade e qualidade da silagem, é imprescindível que o sorgo, independente do híbrido, seja ensilado com 30% a 35% de matéria seca no estádio de grãos farináceos (110 dias após a

semeadura), podendo assim favorecer o desenvolvimento de fermentações láticas durante o processo de conservação.

Segundo Pompeu (2003), das frações da planta de sorgo, o colmo é a porção que menos contribui para a elevação do teor de matéria seca, seguido pelas folhas e a panícula, esta última permitindo grandes ganhos de matéria seca num curto período. Cândido et al. (2002) relatam que de 40-50% da matéria seca deveria ser composta de grãos no momento da ensilagem, na tentativa de garantir qualidade e consumo do material ensilado.

Segundo Jobim et al. (2007), as silagens bem preservadas apresentam valores de pH entre 3,7 e 4,2 e as mal preservadas caracterizam-se por terem altos valores de pH, normalmente entre 5,0 e 7,0, entretanto, dependendo do tratamento que o material recebe antes da ensilagem ou do tipo de aditivo a ser empregado, o pH pode ser elevado (próximo de 5), não significando que seja uma silagem de má qualidade.

Uma das características da planta de sorgo é a presença de compostos fenólicos como os taninos, que são resultantes do metabolismo secundário dos vegetais. Os taninos vêm sendo bastante estudado, principalmente devido ao seu efeito negativo na digestão protéica de monogástricos, porém para os ruminantes, seu efeito anti-nutricional é amenizado pela ação dos microrganismos do rúmen (CABRAL FILHO, 2004).

2.2 Importância do guandu na nutrição animal

A planta de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) vem sendo utilizada em diversas regiões brasileiras para diversos propósitos, mais frequentemente, porém na alimentação animal, tanto como pastagem exclusiva ou consorciada, como também, na forma de forragem verde, feno e silagem (MAIOR JÚNIOR, 2006).

Para Phatak et al. (1993) a utilização do guandu como espécie forrageira é ideal como fonte de proteína barata e pode substituir outras fontes de alimentação animal, com elevados rendimentos de proteína bruta. Os autores afirmam que a porcentagem de proteína bruta no guandu varia de 28,2 a 36,7% na região sudeste dos Estados Unidos.

Massama et al. (1997) afirmaram que o guandu mostrou ser uma planta forrageira viável para formação de banco de proteínas, devido ao seu rápido estabelecimento, apresentando teores de proteína bruta de 120 a 130 g/kg MS. Fernandes et al. (2006) encontraram significativas diferenças para o efeito de altura de cortes e idade nos teores de K, P, Ca, Na, Mg, Zn e Mn em folhas e caules de três cultivares de guandu e concluíram que somente os níveis de P e Mn poderiam ser considerados suficientes para suprir as necessidades nutricionais de ruminantes quando o guandu é usado como forragem aproveitável.

As folhas, os ramos, as flores, as vagens e as sementes do guandu possuem 16 a 23% de proteína bruta e são consumidos voluntariamente a partir do início da floração, em quantidades que variam em torno de 35% do total de forragem ingerida. É mais rico em proteína bruta do que em nutrientes como cálcio e fósforo, como também todas as gramíneas tropicais. A digestibilidade da matéria seca ingerida pode chegar a 79% (PORTAS; SOUZA, 2006).

Um dos méritos mais comumente atribuídos às leguminosas é o incremento no conteúdo de proteína bruta na forragem, exercendo efeito benéfico, principalmente no aumento do conteúdo protéico, em misturas forrageiras. Verifica-se que a mistura entre gramíneas e leguminosas pode reduzir as dependências de suplementação protéica, com menor impacto nas necessidades de suplementação energética.

2.3 Efeito dos taninos no processo de ensilagem

Em relação ao processo de ensilagem, os taninos têm sido apontados como protetores da degradação protéica de forragens (KONDO et al., 2004), pela inibição de enzimas vegetais e microbianas ou pela capacidade de formar complexos com a fração protéica, reduzindo sua degradabilidade e, conseqüentemente, sua disponibilidade (MAKKAR, 2003). Essas observações também encontradas por Gonçalves et al. (1999) que, trabalhando com diferentes híbridos de sorgo, concluíram que as silagens com alta concentração de taninos apresentaram menores valores de nitrogênio na forma de amônia ($N\text{-}NH_3$) como porcentagem do nitrogênio total em relação aos híbridos de menor concentração, mostrando que o maior teor de taninos diminuiu a proteólise nas silagens.

As proteínas diferem de modo significativo quanto à afinidade pelos taninos, sendo as principais características que influenciam positivamente essa associação aquelas relacionadas com o peso molecular da proteína, a estrutura aberta e flexível, o ponto isoelétrico e, principalmente, o conteúdo de prolina, por possuir características hidrofóbicas e contribuir para a conformação mais aberta da molécula de proteína (GUIMARÃES-BEELEN et al., 2006).

A redução na concentração de nitrogênio solúvel e proteólise durante o processo de ensilagem em gramíneas com adição de taninos foi observada por Salawu et al. (1999). Os autores creditam à presença de taninos a redução na degradação de proteína no rúmen e posterior digestão no intestino sem qualquer efeito adverso sobre a digestibilidade total da matéria seca e proteína.

Apesar da ausência de evidências relacionadas à degradação de tanino condensado em condições anaeróbicas (ODENYO et al., 2001). Cummins (1971), ao observar acréscimo na digestibilidade *in vitro* da matéria seca em silagem de sorgo com alta concentração de taninos, credita esse fato à inibição das propriedades dos taninos pelo processo de ensilagem. McSweeney et al. (1999) mencionaram que os mecanismos de degradação dos taninos condensados ainda são pouco conhecidos, contudo é possível que, em ambiente anaeróbico, a acidez do meio propicie a inativação do composto, explicando a possível degradação de taninos condensados em silagem, cujo pH em condições adequadas é ácido. Segundo Kondo et al. (2004), durante a fermentação ocorrida no processo de ensilagem, a atividade microbiana pode degradar taninos condensados a polifenóis de baixo peso molecular.

Outro aspecto interessante abordado por Gonçalves et al. (1999) é a determinação da concentração de taninos nas folhas e colmo, o que é ignorado pela grande maioria dos trabalhos realizados com sorgo, ao considerar que os taninos estão presentes apenas nos grãos. O autor relata valores médios de 6% de taninos condensados presentes nas folhas e colmo, ultrapassando a concentração de 4% observada nos grãos em um dos híbridos avaliados em seu estudo (F-64). No entanto, Cummins (1971) observou que o processo de ensilagem foi eficaz em reduzir a concentração de tanino no grão, mas sua concentração nas folhas e colmo foi pouco afetada, podendo, dessa forma, afetar o processo de digestão pelos animais. O autor considera a falta de estudos que investiguem mais detalhadamente

sobre os efeitos de diluição dos teores de taninos durante a conservação de plantas forrageiras, principalmente leguminosas destinadas para silagem.

Avaliando o processo de fermentação em silagens, Bernardino et al. (1996) observaram redução na digestibilidade *in vitro* da matéria seca dos híbridos de sorgo, diminuição mais acentuada nos híbridos de altos teores de taninos, o resultado apresentado podendo indicar a possibilidade de não ter ocorrido inativação dos taninos presentes na forragem, resultando assim na queda da digestibilidade *in vitro,* ou de outra forma.

2.4 Taninos na nutrição dos ruminantes

Os taninos são representados por um grupo de compostos fenólicos de alto peso molecular, que apresentam a habilidade de formar ligações efetivas com proteínas e outras moléculas, podendo reduzir a disponibilidade de nutrientes para o metabolismo (MAKKAR, 2003).

O conteúdo dos taninos varia com a espécie vegetal, podendo ocorrer diferenças genéticas dentro de uma mesma espécie, possibilitando a seleção de variedade de acordo com o desejado Frutos et al. (2002). A fertilidade do solo e as condições climáticas para o cultivo de leguminosas tropicais afetam também a concentração dos taninos condensados, sua composição monomérica e peso molecular (LASCANO et al., 2001).

Os taninos dividem-se em dois principais grupos: 1) taninos hidrolisáveis (TH), que, após hidrólise, produzem carboidratos e ácidos fenólicos; e 2) taninos condensados (TC) ou não hidrolisáveis, que são resistentes à hidrólise, e são oligômeros dos grupos flavan-3-ols ou flava-3,4-diols (SALUNKHE et al., 1990). Makkar (2003) comentam que taninos condensados podem conter ácido gálico em sua cadeia, o que resultaria em maior atividade biológica do composto.

As diferenças na estequiometria ou número de unidades monoméricas dos taninos condensados podem resultar em uma variedade de estruturas químicas, afetando suas propriedades biológicas (BARRY; McNABB, 1999). De acordo com Schofield et al. (2001) o aumento na relação prodelfinidina:procianidina nos taninos condensados eleva sua capacidade em se ligar às proteínas (Figura 1).

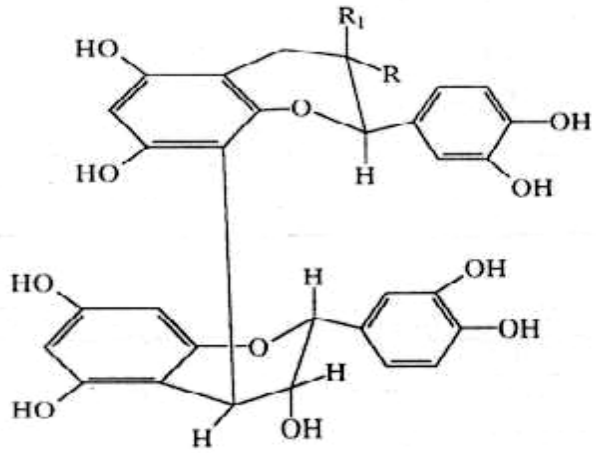

Figura 1. Estrutura química de taninos condensados (SCHOFIELD et al., 2001)

Os taninos, normalmente, encontram-se nos vacúolos das células onde não interferem no metabolismo da planta, agindo apenas com a ruptura da célula, o que pode ser causado por algum choque mecânico, como a mastigação (MIN et al., 2003). Os efeitos antinutricionais dos taninos estão relacionados à sua ação sobre ingestão de matéria seca (BARRY; McNABB, 1999), sua capacidade de se combinar com a proteína da dieta (SCHOFIELD et al., 2001), polímeros como a celulose, hemicelulose e pectina e minerais, diminuindo com isso sua digestibilidade (McSWEENEY, 2001).

Reed (1995) e Makkar et al. (1995) associam em maior parte aos taninos condensados os efeitos antinutricionais pela formação de complexos, sendo creditado ao tanino hidrolisável os efeitos tóxicos ao animal, nos quais as lesões mais comumente observadas são as hemorragias gastrintestinais e necrose do fígado (REED, 1995).

No entanto, McSweeney et al. (2001) mencionam que, tanto os taninos condensados como os hidrolisáveis podem se complexar com as proteínas pela formação de pontes de hidrogênio entre subunidades fenólicas do polímero e os grupos carbonilas dos peptídeos das proteínas.

Os taninos condensados (TC) ligam-se às proteínas e outras macromoléculas principalmente por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, sendo essas ligações reversíveis, dependendo do pH em que os complexos se encontram (MIN et al., 2003). A força com que os taninos se ligam à proteína é determinada pelas características de ambos, como peso molecular, estrutura

terciária, ponto isoelétrico e compatibilidade entre os locais de ligação (SILANIKOVE et al., 2001).

Entre os volumosos mais comumente fornecidos para ruminantes, determinados híbridos de sorgo caracterizam-se por possuir taninos em sua composição, representados, basicamente, por taninos condensados, segundo Carvalho et al. (2008).

A manipulação para remover esses compostos secundários pode interferir nos mecanismos de defesa das plantas, reduzindo sua competitividade entre as espécies. Portanto, ferramentas que possibilitem atenuar o seu efeito sobre o metabolismo animal ou a utilização desses compostos em concentrações que permitam o efeito benéfico parecem ser estratégias adequadas (ODENYO et al., 2001).

Uma das características da planta de sorgo é a presença de compostos fenólicos resultantes do metabolismo secundário (CABRAL FILHO, 2004). Os principais compostos fenólicos presentes na planta de sorgo são os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos (HAHN et al., 1986).

A presença de taninos no sorgo está relacionada a uma série de vantagens agronômicas, como maior proteção contra ataques de pássaros, maior resistência aos fungos causadores de pudridão, redução na germinação de grãos na panícula e maior resitência a insetos (CARVALHO et al., 2008). Porém, para os animais estas substâncias são consideradas como fatores antinutricionais. Segundo D'Mello (1995), o termo "fator antinutricional" é convencionalmente usado para representar substâncias que reduzem a utilização de nutrientes ou inibem o consumo de alimentos pelo animal.

Os ruminantes são mais tolerantes aos taninos devido à ação dos microrganismos do rúmen que diminuem os efeitos negativos destes compostos, pois são capazes de degradar diversos fatores antinutricionais em compostos mais simples e não tóxicos (SELINGER et al., 1986). Entretanto, não acarretaria problemas nutricionais, com exceção dos bezerros, quando ainda não possuem rúmen funcional (JASMAN, 1993).

Algumas pesquisas foram realizadas para melhorar a utilização das plantas taniníferas pelos ruminantes. A adição do polietileno glicol (PEG) e polivinilpoli-pirrolidona (PVPP) têm sido testados por que esses compostos ligam-se aos taninos e deste modo deixando livres as proteínas (GETACHEW et al., 2000). O rompimento

do complexo tanino-proteína aumenta a biodisponibilidade da proteína para a microflora do rúmen o que ocasiona benefícios ao animal.

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

Os efeitos negativos na fermentação ruminal podem ser estudados por meio da técnica *in vitro* de produção de gases, pois estes efeitos são refletidos no volume de gases produzidos. Os resultados deste tipo de estudo podem servir para uma melhor interpretação destes compostos, pois estas interpretações se baseiam em padrões que podem apresentar efeitos biológicos diferentes dos fatores antinutricionais presente nos alimentos (GETACHEW et al., 1998).

Pesquisas para melhorar a utilização de plantas taniníferas pelos os ruminantes por meio de redução do teor de taninos por tratamentos químicos, físicos ou biológicos vêm sendo realizadas (MAKKAR, 2003). Uma técnica amplamente estudada é a adição do polietileno glicol (PEG), que se liga aos taninos e pode reduzir seu efeito negativo (MAKKAR, 2003). Segundo Carvalho et al. (2008) o PEG liga-se aos taninos, inativando-os e permitindo maior disponibilidade do substrato para a fermentação ruminal.

Getachew et al. (1998) notaram maior produção de gases *in vitro* e maior atividade biológica dos microrganismos do rúmen na presença do PEG quando incubaram plantas ricas em taninos. Também Makkar (2001) adicionou PEG na incubação *in vitro* de plantas taniníferas, o que resultou em maior produção de gases, maior concentração de nitrogênio amoniacal e maior produção de ácidos graxos de cadeia curta. Com isso houve uma melhor sincronização da energia disponível e degradabilidade do nitrogênio, o que aumenta consequentemente o desempenho animal.

2.5 Estimativa de metano pela técnica de produção de gases *in vitro*

A técnica de produção de gases *in vitro*, foi descrita há mais de meio século, tempo durante o qual se desenvolveram várias metodologias aceitas e

usadas atualmente em vários grupos de pesquisas. As primeiras mensurações de gases obtidas da incubação de um substrato foram realizadas por McBee (1953) citado por Velásquez (2006), para avaliar o potencial de degradação no rúmen. Theodorou et al. (1994) desenvolveram o uso transdutores de pressão manual, para assim estimar os gases produzidos e inferir à cinética de fermentação no rúmen. Atualmente, as metodologias existentes variam de acordo a fatores como: tipo de transdutor usado; tamanho e quantidade de amostra usada; composição do meio de cultura; preparação e proporção do inoculo; volume incubado, entre outros (RYMER et al., 2005).

O princípio da técnica baseia-se na simulação dos processos metabólicos que acontecem normalmente no rúmen, onde a degradação do alimento depende dos microrganismos e do ambiente ruminal adequado para se manterem ativos e fermentar o alimento. Sob essas condições, há formação de AGCC, além do dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) e produção de massa microbiana Blümmel e Orskov (1994).

A metodologia de Theodorou et al. (1994), tem sido considerada versátil, permitindo trabalhar simultaneamente com um número indeterminado de amostras. O princípio está baseado na mensuração dos gases produzidos pela fermentação dos componentes solúveis e não solúveis do substrato, incubado em frascos de vidro sob condições que simulam o rúmen (temperatura, pH, anaerobiose). A pressão interna dos frascos é registrada em tempos pré-determinados, usando um transdutor de pressão semi-automático. O resultado é obtido pela regressão do volume de gás produzido no tempo de incubação (Theodorou et al., 1994).

Os gases produzidos podem ser um indicador da digestibilidade aparente do alimento no rúmen (BLÜMMEL; ORSKOV, 1994). A grande vantagem da técnica *in vitro* de produção de gases é a praticidade de se medir a produção de gases, com o uso de um transdutor e a pequena quantidade necessária de material para um ensaio.

Através da simulação *in vitro* do ambiente ruminal, a técnica permite além de mensurar a o desaparecimento de material no decorrer do tempo, através da quantificação dos resíduos após a incubação, uma vez que está técnica também mede a formação de subprodutos (gases) da ação microbiana durante o processo de degradação (BUENO, 2002). O principal objetivo da técnica de produção de gases *in vitro* é prover informação que é relevante na interpretação de valores

nutricionais de alimentos e/ou respostas animais e/ou impactos animais no ambiente (KRISHNAMOORTHY et al., 2005).

De acordo com Getachew et al. (2004), a quantidade de gases produzidos de um alimento em incubação reflete a produção de AGCC, os quais são a principal fonte de energia dos ruminantes. Os gases surgem diretamente da degradação microbiana dos alimentos, e indiretamente da reação do tampão com os ácidos gerados como resultado da fermentação.

Segundo Longo et al. (2006), usando a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, e colhendo os gases produzidos em intervalos regulares, o metano pode ser quantificado por cromatografia gasosa. Segundo os autores, essa técnica apresenta a vantagem tais como o maior controle sobre as condições experimentais e o menor tempo experimental, demonstrando aplicabilidade para avaliação de alimentos quanto ao potencial de mitigação de metano entérico.

3 EFEITOS DA ADIÇÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE GUANDU SOBRE AS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS E FERMENTATIVAS DA SILAGEM DE SORGO

Resumo

A planta de sorgo é uma das espécies mais adaptadas à produção de silagem, apresentando facilidade de cultivo, altos rendimentos e produção de silagem de boa qualidade. Entretanto, o sorgo pode apresentar a presença de taninos condensados na planta inteira, e para os animais estas substâncias são consideradas fatores antinutricionais. Foi objetivo desta pesquisa avaliar os efeitos da adição de níveis crescentes de forragem de guandu na composição química-bromatológica e na qualidade fermentativa da silagem de sorgo granífero. Os tratamentos foram compostos por T1 - silagem com 100% de sorgo, T2 - silagem com 25% de guandu e 75% de sorgo, T3 - silagem com 50% de guandu e 50% de sorgo, T4 - silagem com 75% de guandu e 25% de sorgo e T5 - silagem com 100% de guandu com base na matéria fresca. As silagens foram produzidas em 20 silos experimentais de canos de PVC (quatro repetições/tratamento). A abertura dos silos ocorreu 54 dias após a ensilagem, quando foram determinados a composição química-bromatológica e parâmetros fermentativos das silagens. A adição de guandu promoveu efeito linear crescente ($P<0,01$) nas silagens para o teor de proteína bruta, fenóis totais e taninos totais, o mesmo ocorrendo para perdas por fermentação, mas com redução nos teores de matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. Para as variáveis matéria mineral, pH, capacidade tampão e carboidratos totais verificaram-se respostas quadráticas crescentes ($P<0,01$) e resposta quadrática decrescente para taninos condensados entre as silagens. A inclusão de forragem de guandu até o nível de 75% é uma alternativa viável para melhoria do valor nutritivo da silagem de sorgo e as silagens estudadas apresentaram teores aceitáveis de compostos fenólicos e podem ser utilizados na alimentação de ruminantes.

Palavras-chave: taninos, sorgo, leguminosa, proteína, silagem.

EFFECTS OF GUANDU ADDITION WITH INCREASING LEVELS ON CHEMICAL AND FERMENTATION CHARACTERISTICS OF SORGHUM SILAGE

Abstract

The sorghum plant is one of the most suitable for silage production, with higher yields and production of good quality silage. However, sorghum can have condensed tannins in the whole plant, which for animals, these substances are considered antinutritional factors. Thus, this work aimed to evaluate the chemical composition of sorghum silage with increase addition of *Cajanus cajan* (pigeon pea). The treatments were T1 - silage with 100% sorghum, T2 - silage with 25% of pigeon pea and sorghum 75%, T3 - silage with 50% of pigeon pea and sorghum 50%, T4 - silage with 75% pigeon pea and 25% of sorghum and T5 - silage with 100% pigeon pea based on fresh matter. The silages were produced in 20 experimental silos tubes (four replicates / treatment). The silos were opened 54 days after ensiling, Chemical composition and silage fermentation parameters indicated that, the addition of pigeon pea promoted significant ($P<0.01$) increase in crude protein (g/kg DM) in silage, total phenols and total tannins, and the same occurred with fermentation products lost, but with reduction in dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF). Other variables: ash, pH, buffer capacity and total carbohydrates were found in a quadratic significant increasing ($P <0.01$) whereas for condensed tannins, there was found decreasing quadratic response among silages. The inclusion of pigeon pea to the level of 75% is a viable alternative for improving the nutritional value of sorghum silage. It was also concluded that the silages studied showed acceptable levels of phenolic compounds.

Keywords: tannins, sorghum, legume, protein, silage.

3.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a estacionalidade das forrageiras tropicais afeta diretamente a produção animal. Este fato é devido entre outros fatores, à distribuição pluviométrica ao longo do ano. Neste contexto, o sucesso da produção animal depende de novas tecnologias, como a produção de silagem, que favorece a máxima utilização da terra, produzindo volumosos de alto valor nutritivo para serem utilizados no período de estiagem (SOUZA et al., 2008).

A silagem pode ser definida como um alimento volumoso obtido de forragens produzidas na estação das águas, conservadas através de fermentações anaeróbias, para ser oferecida no período de escassez, garantindo a eficiência de utilização da forragem produzida. Este processo de conservação de forragem tem como objetivo final preservar forragens de alto valor nutricional com o mínimo de perdas. No processo, basicamente carboidratos solúveis são convertidos em ácidos orgânicos pela ação de microrganismos, que encontrando ambiente ideal proliferam e criam condições adequadas à conservação.

A silagem de milho é considerada padrão, e seu valor nutritivo é tomado como referência, mas o alto valor comercial do milho grão, que é utilizado na alimentação humana e de animais não ruminantes, obriga a busca por novas culturas. O uso do sorgo na forma de silagem é favorecido pelo fato de essa cultura apresentar bons teores de carboidratos solúveis, capacidade tampão relativamente baixa, conteúdo de MS acima de 20% e estrutura física que facilita a picagem e a compactação durante o enchimento do silo (PEREIRA et al., 2007).

Alimentos como as leguminosas forrageiras surgem como alternativa para assegurar um bom padrão alimentar dos animais, notadamente durante o período seco, já que estas, em relação às gramíneas, apresentam alto conteúdo protéico, melhor digestibilidade e maior resistência ao período seco. O guandu (*Cajanus cajan* L. Millsp), leguminosa rica em proteína bruta, pode ser fornecida aos animais na forma de feno, triturada verde para ser consumida no cocho ou como aditivo para melhorar o valor nutritivo da silagem quando misturada com outras forrageiras (FAVORETTO et al., 1995).

Pressupõe-se que a associação de gramínea com leguminosa pode melhorar a degradação de MS no rúmen e, portanto, aumentar a energia disponível destes alimentos aos animais, pelo fato de haver incremento significativo na

disponibilidade de nitrogênio aos microrganismos, podendo significar redução na dependência de suplementação energética (DIAS, 2007).

O conteúdo de taninos nas plantas pode variar de acordo com as condições do solo, local, clima, espécie, idade da planta e apresenta uma composição química variada sendo, muitas vezes, pouco conhecida e pesquisada. Os efeitos dos taninos incluem a inibição da fermentação no rúmen e a formação de complexos com enzimas digestivas, proteínas e fibras, tornando a digestão mais difícil. Em teores elevados, os taninos podem ter efeitos prejudiciais, reduzindo a aceitabilidade, pelos animais, o consumo e a digestibilidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química-bromatológica e qualidade fermentativa da silagem de sorgo granífero com adição de níveis crescentes (25, 50, 75 e 100%) de guandu.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), localizada no município de Piracicaba (SP), no período de janeiro a junho de 2006. A precipitação pluviométrica e a temperatura média mensal observada durante o período experimental encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados meteorológicos mensais do primeiro semestre (período experimental) de 2006 em Piracicaba – SP.

Mês	Tmax (°C)[1]	Tmín (°C)[2]	Tmed (°C)[3]	Precipitação Pluviométrica (mm)
Janeiro	31,4	19,6	25,5	240,5
Fevereiro	30,3	19,5	24,9	176,2
Março	30,9	19,3	25,1	154,0
Abril	28,3	15,8	22,1	33,7
Maio	25,4	10,7	18,0	2,0
Junho	26,2	10,3	22,1	18,6

[1]Tmax = temperatura máxima mensal; [2]Tmín = temperatura mínima mensal; [3]Tmed = temperatura média.

3.2.2 Preparo do solo e plantio das culturas

A instalação do experimento foi realizada no mês de janeiro de 2006, quando foram feitas a caracterização química da camada arável do solo, em área de aproximadamente 50 m^2, quando foi coletada uma amostra composta de solo na profundidade de 0-20 cm. A análise química do solo foi realizada no Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

da Universidade de São Paulo em Piracicaba - SP. Os resultados das características químicas do solo estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de análise química do solo (0 - 20 cm).

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
$CaCl_2$	$g.dm^{-3}$	$Mg.dm^{-3}$			$Mmol_c.\ dm^{-3}$				%
6,8	37	81	11,6	135	39	11	185,6	196,6	94

O solo foi preparado com trator, sendo feitas duas gradagens. Em função dos resultados da caracterização química do solo, não foi recomendada a prática de calagem. A adubação de plantio foi constituída de 300 kg/ha de fertilizante N-P-K, na formulação 10-10-10 ($N\text{-}P_20_5\text{-}K_20$) conforme recomendações práticas. Para o plantio foram utilizadas sementes certificadas das plantas forrageiras de sorgo granífero cv. BR306 e guandu cv. IAPAR 43 de alta produção e valor nutritivo, obtidas na empresa Piraí do Município de Piracicaba-SP.

O plantio foi efetuado em linhas distanciadas de 0,60 e 0,90 m, com 14 plantas por metro linear, em uma área útil de 50 m^2. Aos 28 dias após plantio, realizou-se um desbaste, deixando-se 14 plantas por metro linear segundo as recomendações de Evangelsta et al. (2005) e Moreira et al. (2003). As plantas invasoras foram controladas por capinas realizadas a enxada aos 44 e 90 dias após o plantio.

3.2.3 Preparo da ensilagem e tratamentos estudados

O sorgo e o guandu foram colhidas com idades fisiológicas equivalente a 102 dias de crescimento vegetativo com 32% de matéria seca (MS) para o sorgo (EVANGELISTA et al., 2005) e com 30% de matéria seca para o guandu, fase recomendada para produção de silagem (FAVORETTO et al., 1995).

Após o corte, foram avaliados os rendimentos das produções de matéria verde (PMV), pesando-se as plantas para cada espécie e em seguida, conduzidas ao LANA-CENA/USP.

Foram avaliados cinco níveis de adição de guandu na ensilagem de sorgo granífero, constituindo os tratamentos de: T1 - silagem com 100% de sorgo, T2 - silagem com 25% de guandu e 75% de sorgo, T3 - silagem com 50% de guandu e 50% de sorgo, T4 - silagem com 75% de guandu e 25% de sorgo e T5 - silagem com 100% de guandu.

As plantas foram picadas, separadamente, em picadeira convencional de forragem, regulada para tamanho médio de partícula de 1 a 2 cm. Para o preparo das silagens mistas, as forragens foram pesadas nas devidas proporções, peso a peso, e cada mistura foi homogeneizada antes de ser ensilada. O material picado foi ensilado em silos de laboratório confeccionados com tubos de “PVC” de dez centímetros de diâmetro e quarenta centímetros de comprimento. A forragem foi compactada, com caibro de madeira, tomando-se como critério a acomodação de camadas de aproximadamente 5 cm de espessura, de forma que a pressão exercida em cada silo experimental fosse semelhante para todos os silos e tornasse possível uma densidade da massa ensilada próxima de 500 a 600 kg/m^3 para uma adequada simulação de um silo; sendo ensilado aproximadamente 1,5 a 2,0 kg de forragem por silo (v = 0,00314 m^3).

Os silos foram fechados com tampas tipo “capes”, utilizando-se fita adesiva, pesados, armazenados verticalmente em local abrigado no Biotério do LANA-CENA/USP e abertos após 54 dias de estocagem.

3.2.4 Análise química da forragem

No momento da ensilagem, foram coletadas amostras de material fresco, para avaliação da qualidade nutricional das forragens antes da ensilagem através de determinações químicas e determinação do pH conforme Silva e Queiroz (2002) e capacidade tampão (CT) segundo método de Playne e McDonald (1996).

A secagem da forragem original foi realizada por liofilização por um período de 72 horas, sendo a água removida por sublimação a -40°C, com a finalidade de garantir a preservação dos nutrientes e compostos fenólicos presentes

na forragem. Para as determinações químicas da forragem, uma amostra representativa foi moída em moinho tipo Willey e peneirada em malha de 1 mm. Todas as análises foram feitas com duas repetições para cada amostra. A quantidade de matéria seca (MS) foi obtida pela secagem das amostras a 105°C até peso constante em estufa de circulação de ar, calculando a diferença de massa antes e após a secagem, matéria mineral (MM) e proteína bruta (PB) segundo as recomendações da AOAC (1995). As determinações da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram feitas de acordo com Mertens (2002).

Os conteúdos de fenóis totais (FT) e taninos totais (TT) foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu e taninos condensados (proantocianidinas) pelo método butanol-HCl (MAKKAR, 2000), tendo as amostras sido moídas e peneiradas em malha com diâmetro de 0,25 mm.

Para extração dos fenóis e taninos, 200 mg de amostra seca e moída foram transferidos para béqueres de 30 mL. Em seguida adicionou-se 10 mL de solução de acetona 70%. Os béqueres foram colocados em banho de ultra-som (QH-Kerry) com gelo, por 20 min. Posteriormente, o material foi centrifugado a 700 x g (Centra IEC) por 10 min e temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo de ensaio de 15 mL e utilizados para determinações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados por colorimetria, sendo denominado *extrato*. Foram feitas diluições do extrato quando necessárias.

Para determinação de fenóis totais, uma alíquota de 50 μL do extrato foi retirada e colocada em tubos de ensaio de 15 mL e o volume completado para 500 μL com água destilada. Posteriormente, 0,25 mL do reagente Folin Ciocalteu (2N) e 1,25 mL de solução de carbonato de sódio a (40 g Na_2CO_3 em 200 mL de água destilada) foram adicionados. Os tubos foram agitados em agitador elétrico e após 40 min, foi feita a leitura em espectrofotômetro (DU – 64 BECKMAN), em absorbância a 725 nm. O teor de fenóis totais (FT) foi calculado em equivalente de ácido tânico, pela curva de calibração, e expresso com base na matéria seca.

A curva padrão foi preparada tomando-se alíquotas 0, 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,10 mL de solução stock de ácido tânico (0,1 mg/mL). A concentração total de fenóis foi calculada em equivalente de ácido tânico, usando equação de regressão obtida pela curva padrão.

Para taninos totais (TT), em tubos de ensaio de 15 mL foram pesados 100 mg de PVPP (polivinilpolipilorridona) e pipetados 1000 μL de água destilada e 1000 μL do extrato.

Após agitação, os tubos foram colocados em geladeira por 15 min e em seguida, agitados novamente. Os tubos foram centrifugados a 700 x g por 10 min à 4°C por 10 min e o sobrenadante foi coletado. Do sobrenadante, 100 μL foram pipetados em tubos de ensaio (em duplicata), e aos tubos foram adicionados 400 μL de água destilada, 250 μL do reagente Folin-Ciocalteu (1 N) e 1,25 mL de solução de carbonato de sódio a (20 %). Após 40 min, foi feita a leitura em espectrofotômetro, em absorbância a 725 nm.

O cálculo de TT foi feito pela diferença entre as leituras dos tubos sem PVPP (fenóis totais) e os tubos com PVPP. A resposta foi expressa em equivalentes de ácido tânico.

Para taninos condensados (TC), uma alíquota de 500 μL do extrato de cada amostra foi retirada e colocada em três tubos de ensaio de 15 mL. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de reagente butanol-HCl e 0,1 mL de reagente férrico, sendo em seguida agitado, agitado em agitador elétrico. Após essa etapa, um dos tubos foi separado e guardado em local escuro, o qual foi denominado branco. Os dois outros tubos foram aquecidos a 100°C por 60 min. Após o resfriamento, todos os tubos foram analisados em espectrofotômetro a 550 nm.

A concentração de taninos condensados foi expressa em equivalente grama de leucocianidina por kg de MS (eq-g leucocianidina/kg MS), obtida conforme expressão: (A 500 nm x 78,26 x fator diluição) / (g/kg MS) (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1986).

3.2.5 Abertura dos silos experimentais

Os silos experimentais foram abertos após 54 dias do fechamento, de acordo com o seguinte procedimento: pesagem dos silos antes da abertura para determinação das perdas de MS por fermentação, calculadas como a diferença entre os pesos das massas obtidas no enchimento e na abertura dos silos

multiplicados pelos respectivos teores de MS segundo metodologia (SCHIMIDT, 2006). Finalmente, as perdas foram transformadas em g/kg de MS:

$$PMS = \frac{[(MSi - MSf)]}{MSi} \times 100$$

Onde: PMS = Perda total de MS (g/kg MS)

Msi = Quantidade de MS inicial. Peso do silo após enchimento – peso conjunto vazio, sem a forragem, antes do enchimento (tara seca) x teor de MS da forragem na ensilagem; Msi = Quantidade de MS final. Peso do silo cheio antes da abertura – peso conjunto vazio, sem a forragem, após abertura dos silos (tara úmida) x teor de MS da forragem na abertura.

Na retirada das amostras de silagem foram desprezados os 5 cm das porções superiores e inferiores dos silos. Todo o material restante de cada silo foi dividido em duas porções iguais e congelado imediatamente para futuras determinações.

3.2.6 Análise química da silagem

Para a análise química das silagens, uma amostra de cada silo foi preparada e analisada conforme descrito em 3.2.4.

Os carboidratos totais (CHOT) foram determinados de acordo com a metodologia de Dubois et al. (1966) e o ácido lático, segundo metodologia descrita por Erwin et al. (1961).

3.2.7 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, constituído por cinco tratamentos e quatro repetições.

Os dados foram analisados usando-se o programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2000), sendo anteriormente verificada a

normalidade pelo Teste de Shapiro-Wilk. Além disso, foi realizada a análise de variância e regressão polinomial nos dados relativos à composição química e fermentativa das silagens. A escolha dos modelos foi baseada na significância dos efeitos em linear e quadrático, ao nível de 1% de probabilidade.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Características agronômicas

A Tabela 3 revela as produções de matéria verde (PMV) e matéria seca (PMS) das forrageiras de sorgo granífero e guandu. Os dados obtidos, não foram avaliados estatisticamente, e estão baseados em valores absolutos.

Tabela 3 - Produções médias das plantas forrageiras estudadas destinadas ao processo de ensilagem

Variáveis*	Forrageiras estudadas	
	Sorgo granífero	Guandu
PMV	53.000	14.555
PMS	16.970	4.510

* PMV: produção de matéria verde (kg/ha); PMS: produção de matéria seca (kg/ha).

Evidenciam-se maiores quantidades de PMV e PMS para o sorgo granífero (53.000 kg/ha e 16.970 kg/ha) e menores quantidades de forragem para o guandu (14.555 kg/ha e 4.510 kg/ha). Esses resultados obtidos na cultura de sorgo são superiores ao limite estabelecido por Restle et al. (2002) que afirma que produções de matéria verde inferiores a 40 t/ha são economicamente inviáveis. Os valores quanto às produções de matéria seca (PMS) neste experimento foram semelhantes aos encontrados por (SILVEIRA et al., 2005) de 16.380 kg/ha. Segundo Oliveira et al., 2005) esses valores são considerados ótimos para o primeiro corte para produção de silagem.

Em relação ao guandu, a produção de matéria seca (PMS) encontrados no presente experimento foi superior quando comparada com os resultados de Silvera et al. (2005) que encontraram valores de 2.348 kg/ha aos 98 dias após a emergência. Favoretto et al. (1995) verificaram que as produções de matéria seca

do guandu diminuíram substancialmente no período da estiagem, fato não ocorrido neste experimento.

O conteúdo de matéria seca (MS) do sorgo granífero antes de ensilar foi de 32%, portanto dentro dos limites adequados e recomendados por Evangelista et al. (2005) e de 31% de matéria seca (MS) para o guandu, fase recomendada para o corte para produção de forragem aproveitável (MOREIRA et al., 2003).

3.3.2 Análise química da forragem

Os resultados das análises da composição química-bromatológica dos componentes vegetais *in natura* no momento da ensilagem podem ser observados na Tabela 4. Os teores das diversas frações de MS, PB, MM, pH, CT para o sorgo e guandu foram semelhantes aos resultados reportados na literatura (EVANGELISTA et al., 2005; FAVORETTO et al., 1995). A inclusão do guando influenciou significativamente ($P < 0,01$) nas características químicas observadas.

Evangelista et al. (2005) recomendou o corte do sorgo para ensilagem com 28% a 38% de MS, ou seja, estádio em que os grãos encontram-se no ponto farináceo. O teor de MS do sorgo no momento da ensilagem foi de 320g/kg de MS, portanto dentro dos limites adequados.

Para os teores de PB na forragem de guandu, os valores encontrados no presente experimento (187 g/kg MS de PB) foram superiores aos encontrados por Godoy (2007), que observaram valores de PB (142,8 g/kg MS).

Amostras coletadas de forragem de sorgo e guandu no momento da ensilagem apresentaram teores baixos de FT, TT e TC. O sorgo apresentou maior quantidade de TC em comparação ao guandu (14 e 3 eq. g lecocianidina / Kg MS) e menor quantidade de FT e TT (26 e 30; 17 e 22 eq. g ác. tânico / kg MS) em comparação ao guandu (Tabela 4).

Tabela 4 - Composição química da forragem na ensilagem.

Variáveis*	Níveis de guandu (%)					EP[3]
	0[1]	25	50	75	100[2]	
MS	320,1	316,1	310,8	307,4	309,9	6,02
pH	4,6	5,0	5,1	5,8	5,8	0,02
CT	10,3	16,8	19,1	24,1	25,7	0,37
PB	82,3	102,2	125,3	129,2	186,5	3,08
MM	94,3	88,2	92,6	88,9	84,0	1,54
FT	25,5	28,3	29,2	29,9	30,3	0,36
TT	17,3	18,5	20,3	20,9	22,5	0,33
TC	14,3	10,7	6,22	4,1	2,9	0,18

[1]sorgo; [2]guandu; [3]erro padrão; *MS: matéria seca (g/kg matéria fresca); PB: proteína bruta (g/kg MS); MM: matéria mineral (g/kg MS); pH; CT: capacidade tampão (meq/100 g MS de forragem); FT: fenóis totais (eq-g de ácido tânico/kg MS); TT: taninos totais (eq-g de ácido tânico/kg MS); TC: tanino condensado (eq-g de leucocianidina/kg MS).

De acordo com Barry, Manley e Duncan (1986) e Godoy (2007), para TC, o limite considerado seguro para os ruminantes encontra-se na faixa de 30 a 40 eq-g de leucocianidina/kg de MS. De acordo com (BARRY; MANLEY; DUNCAN, 1986) citado por (NOZELLA, 2006) nessa faixa, o efeito é benéfico devido à proteção contra a degradação microbiana, podendo aumentar a quantidade de proteína não degradada que chega ao intestino.

Foi observado (Tabela 4) que os valores de TC nas plantas estudadas, não apresentam risco para os animais, quando seriam fornecidas como única fonte ou misturada como alimento *in natura*, pois as duas plantas apresentaram valores de 14,3 e 2,9 eq-g de leucocianidina/kg de MS.

3.3.3 Análise da composição química-bromatológica da silagem

Os dados referentes à composição química-bromatológica das silagens com inclusão de guandu estão apresentados na Tabela 5.

A medida que se aumentou o nível de adição do guandu, verificou-se efeito linear decrescente (P<0,01) para o teor de MS, em função do aumento dos

níveis de inclusão de guandu na massa ensilada, apresentando uma média geral de 266,4 g/kg MS.

Tabela 5 - Composição química-bromatológica das silagens.

Variáveis	Níveis de guandu (%)					Média	CV	Probabilidade	
	0	25	50	75	100			L	Q
MS	300,5	275,0	264,4	253,2	239,2	266,4	3,5	0,0001	ns
PB	82,2	101,9	118,9	129,0	173,3	121,0	10,9	0,0001	ns
FDN	678,2	601,4	581,1	571,5	519,3	590,3	4,7	0,0001	ns
FDA	360,7	355,4	343,0	322,8	317,2	339,8	6,3	0,0001	ns
CHOT	52,8	68,0	83,0	79,0	33,1	63,2	13,0	ns	0,0001
MM	68,6	67,8	66,0	65,8	68,1	67,3	2,0	ns	0,0001
FT	18,0	19,2	19,1	19,8	22,7	19,8	7,4	0,0007	ns
TT	14,9	14,4	14,4	14,5	16,3	14,9	8,6	0,1689	ns
TC	14,3	10,7	6,2	4,1	2,9	7,6	18,3	0,0001	0,0001

MS: matéria seca (g/kg matéria fresca) à 105°C; PB: proteína bruta (g/kg MS); MM: matéria mineral (g/kg MS); FDN: fibra em detergente neutro (g/kg MS); FDA: fibra em detergente ácido (g/kg MS); CHOT: carboidratos totais (% MS); FT: fenóis totais (eq-g de ácido tânico/kg MS); TT: taninos totais (eq-g de ácido tânico/kg MS); TC: tanino condensado (eq-g de leucocianidina/kg MS); ns: não-significativo; CV: coeficientes de variação (%); L: probabilidade para o efeito linear; Q: probabilidade para o efeito quadrático.

Foi observado decréscimo de 0,57% no teor de MS da silagem por unidade de guandu adicionada (Figura 2). Verifica-se que o teor de MS com mistura de até 75% de guandu na silagem de sorgo é considerada ideal para se obter uma silagem de boa qualidade, com valor médio de 253,28 g/kg de MS. Resultados semelhantes foram encontrados por Evangelista et al. (2005) trabalhando com adição de 40% de leucena na silagem de sorgo. Os mesmos autores citam que, silagens excessivamente úmida propicia condições favoráveis à fermentação butírica, favorecendo também a perda de princípios nutritivos pela lixiviação e degradação das proteínas, enquanto que forragem com teor de MS elevado dificulta a compactação e a expulsão do ar no processo da ensilagem.

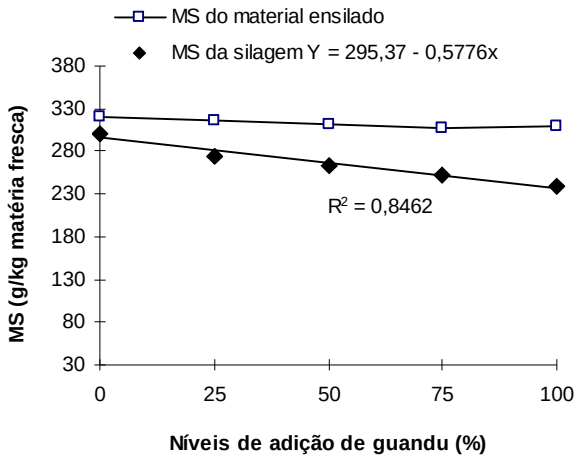

Figura 2 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de matéria seca (g/kg matéria fresca) da silagem de sorgo

Houve resposta linear positiva para a variável PB em função do aumento nos níveis de inclusão de guandu na silagem de sorgo (Figura 3). Os teores de PB variaram de 82,16 g/kg MS (0% de guandu) até 173,30 g/kg MS (100% de guandu). Esse resultado pode ser explicado pelo maior teor de PB no guandu em relação ao sorgo. O teor de PB das silagens supera os teores mínimos de 60 a 80 g/kg MS, necessários para que ocorra fermentação microbiana efetiva no rúmen, teores de PB na MS inferiores a 70 g/kg MS afetam de forma negativa o consumo e digestibilidade de nutrientes devido à deficiência de nitrogênio no rúmen, o que pode se agravar se a proteína da silagem for solubilizada na forma de amônia (VAN SOEST, 1994).

Pereira et al. (2004) também obtiveram aumentos no teor de PB, quando ensilaram milho com leucena. Pereira et al. (1998) encontraram teores de PB de 64 e 100 g/kg MS em silagens de capim-elefante com níveis de 20 e 40% de leucena, e 44 g/kg MS em silagem de capim-elefante puro. Por outro lado, durante a fermentação no silo, uma parte da PB é degradada a nitrogênio não-protéico.

A presença de nitrogênio amoniacal é um indicador da extensão com que ocorreu a atividade de clostrídeos, uma vez que esse produto é produzido em pequenas quantidades por outros microganismos da silagem e enzimas da planta (JOBIM et al., 2007).

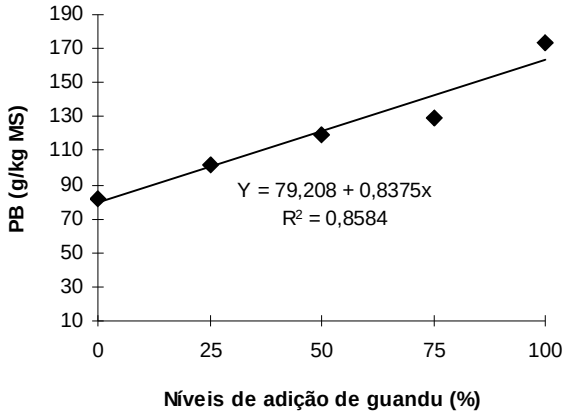

Figura 3 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de proteína bruta (g/kg MS) da silagem de sorgo

Nas Figuras 4 e 5 estão apresentadas as equações de regressão estimada para os valores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) em relação à mistura da forragem de guandu ao sorgo. Para essas características, a regressão linear foi significativa a 1% e valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 78 e 47%.

Os teores de FDN e FDA nas silagens com mistura de forragem de guandu foram menores que aquelas observadas nas silagens de sorgo puro. Verifica-se que as quantidades de FDN e FDA reduziram linearmente com a mistura de guandu na silagem de sorgo.

O teor de FDN passou de 678 para 519 g/kg MS nas silagens de 0% de guandu e 100% de guandu, respectivamente. Esses resultados podem ser explicados pelo maior teor de relativo do conteúdo de tecidos estruturais, possivelmente a lignina presente na planta de sorgo em relação à planta de guandu no momento da ensilagem. Resultados semelhantes foram encontrados por DIAS (2007), que constatou redução no teor de FDN de silagens de sorgo devido à presença de soja, sendo os valores 657 e 629 g/kg MS, respectivamente, para a silagem de sorgo exclusivo e silagem proveniente do consórcio sorgo-soja, quando está perfazia 11% da MS ensilada.

A redução nos teores de FDN das silagens pode contribuir para aumentar o consumo de MS. Segundo Van Soest (1994) elevados teores de FDN e FDA interferem no consumo e na digestibilidade da MS. Ainda segundo o autor, valores

de FDN superiores a 550-600 g/kg MS correlacionam-se negativamente com o consumo de alimento. Eichelberg et al. (1997a) verificaram que a adição de 40% de forragem de soja ao milho promoveu redução no teor de FDN, de 654 para 600 g/kg MS, e elevação no teor de FDA de 321 para 339 g/kg MS. Mello et al. (2005) avaliando a composição bromatológica de silagens obtiveram valores de 347 e 338 g/kg MS de FDA para as silagens de sorgo e girassol, respectivamente sendo estes valores próximos dos encontrados neste trabalho. Os valores de FDA podem restringir a qualidade da fração fibrosa das silagens, podendo limitar sua utilização para categorias de animais mais exigentes (CASTRO et al., 2008).

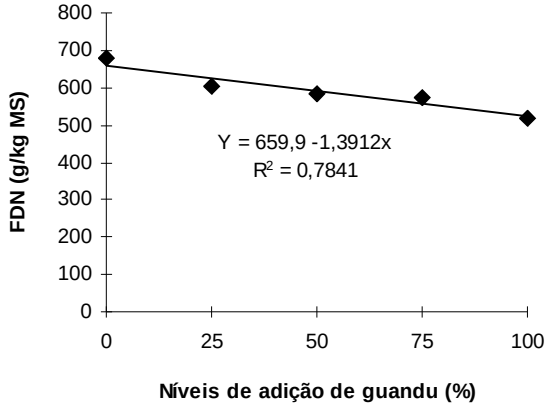

Figura 4 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de fibra em detergente neutro (g/kg MS) da silagem de sorgo

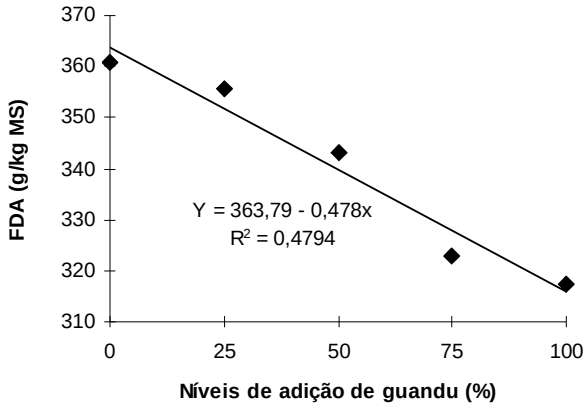

Figura 5 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de fibra em detergente ácido (g/kg MS) da silagem de sorgo

Para os teores de carboidratos totais (CHOT), a regressão quadrática foi significativa a 1% e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 93% (Figura 6). Pelos resultados observa-se aumento de CHOT até aproximadamente 50% de mistura de forragem de guandu na ensilagem de sorgo. Fato justificado pelos menores teores deste nutriente no guandu (33,12% de CHOT) em relação ao sorgo (52,87% de CHOT). Como as bactérias também utilizam a hemicelulose como substrato para fermentação, segundo McDonald (1991), é possível que tal fato justifique a redução desse nutriente nas silagens. Outra justificativa, segundo Garcia et al. (2008), seria que o guandu apresente moderada quantidade de hemicelulose em relação ao sorgo.

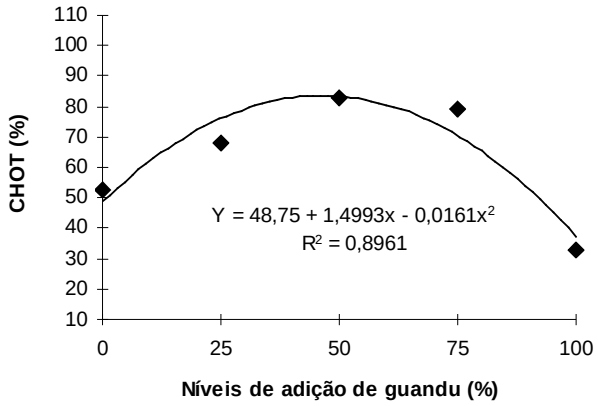

Figura 6 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de carboidratos totais (%) da silagem de sorgo

Os dados de matéria mineral (MM) apresentaram efeito quadrático decrescente com adição de guandu na silagem de sorgo (Figura 7). Os resultados mostraram maiores valores na silagem com 0% de inclusão de guandu (68,6 g/kg MS).

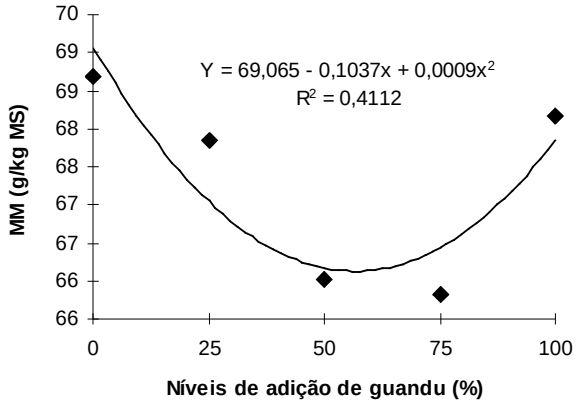

Figura 7 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de matéria mineral (g/kg MS) da silagem de sorgo

Este maior teor de resíduo mineral foram maiores aos encontrados por Eichelberg et al. (1997a) trabalhando com silagem de milho misturado com feijão miúdo com valor igual a 48 g/kg MS de matéria mineral. No entanto, eles foram inferior aos encontrados por Pereira et al. (2004) apresentando valor médio de 90 g/kg MS quando trabalho com silagem de milho misturado com leucena.

À medida que elevou o nível de inclusão de guandu na silagem de sorgo, os teores de FT e TT das silagens aumentaram linearmente (Tabela 5, Figuras 8 e 9).

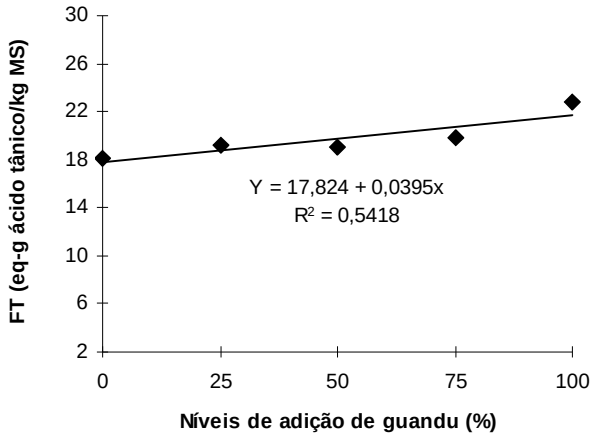

Figura 8 - Efeito de níveis de inclusão de guandu nos teores de fenóis totais (eq-g ácido tânico/kg MS) da silagem de sorgo

Houve comportamento quadrático altamente significativo para TC em função dos níveis de guandu nas silagens estudadas (Tabela 5). Nota-se na Figura 10, que à medida que aumenta o nível de forragem de guandu nas silagens, diminuíram os teores de TC.

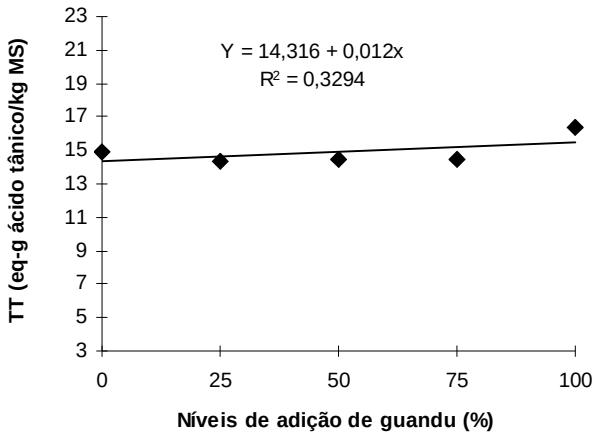

Figura 9 - Efeito de níveis de inclusão de guandu no teor de taninos totais (eq-g ácido tânico/kg MS) da silagem de sorgo

Segundo Vitti et al. (2005), os mecanismos de degradação dos taninos condensados ainda são pouco conhecidos. Para McSweeney et al. (1999) contudo é possível que, em ambiente anaeróbico, a acidez do meio propicie a inativação do composto, explicando a possível degradação de taninos condensados durante a fermentação na silagem, cujo pH em condições adequadas é ácido. Segundo Kondo (2004), durante a fermentação da forragem ocorrida pela atividade microbiana pode degradar taninos condensados a compostos fenólicos de baixo peso molecular.

Os taninos podem ser responsáveis por efeitos adversos ou benéficos ao metabolismo animal, dependendo de suas características estruturais, concentração no alimento, estágio fisiológico do animal e composição da dieta (SCHOFIELD et al., 2001).

Alguns autores citam que, para os TC, o limite considerado seguro para os ruminantes encontra-se na faixa de 30 a 40 eq-g leucocianidina/kg MS (BARRY; MANLEY; DUNCAN, 1986). De acordo com esses autores, nessa faixa, o efeito é

benéfico devido à proteção contra a degradação microbiana, podendo aumentar a quantidade de proteína que chega ao intestino.

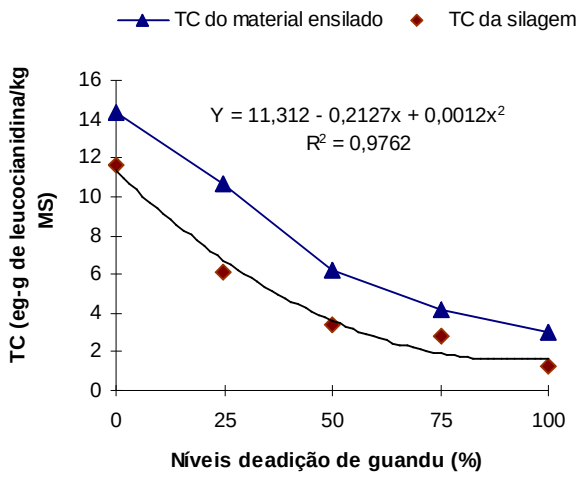

Figura 10 - Efeito de níveis de inclusão de guandu nos teores de taninos condensados (eq-g de leucocianidina/kg MS) da silagem de sorgo

Os resultados de TC encontrados por Vitti et al. (2005) para a forragem de guandu coletada na região de Pernambuco, são próximos (2 eq-g leucocianidina/kg MS) aos resultados do presente trabalho.

Os teores de TC nas silagens apresentaram teores considerados baixos, oferecendo nenhum risco ao ser consumido pelos animais, uma vez que todos os tratamentos apresentaram valores inferiores aos apresentados na literatura como sendo prejudiciais aos animais (acima de 40 eq. g / Kg de MS).

3.3.4 Análise do perfil fermentativo das silagens

Na Figura 11, está representada a equação de regressão estimada para os valores de pH das silagens em relação aos níveis de guandu na silagem.

Para esta variável a resposta foi quadrática significativa a 1% e o coeficiente de determinação (R^2) foi igual a 93%. Neste experimento, observou-se variação nos valores de pH com inclusão de forragem de guandu (3,71 a 4,95).

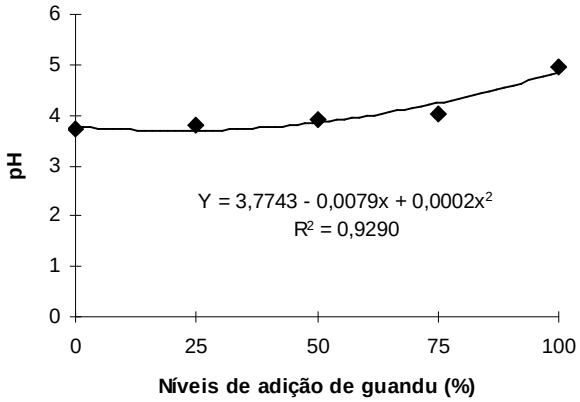

Figura 11 - Efeito de níveis de inclusão de guandu para os resultados de pH da silagem de sorgo

Nas condições de pH 4,95, segundo McDonald (1991) há maior desenvolvimento de bactérias do gênero *Clostridium*. Neumann et al. (2004) mencionaram que o limite superior de pH para as silagens de qualidade satisfatória é de 4,2. Entretanto de acordo com Souza et al. (2003) as silagens são classificadas como excelentes, quando apresentam pH menores que 4,4 para teores de MS variando de 260 a 350 g/kg MS.

Quanto à qualidade fermentativa das silagens, medida pelos valores de pH, pode-se sugerir que os níveis de mistura de 25 a 75% de forragem de guandu na ensilagem de sorgo proporcionaram bom padrão de fermentação com pH desejáveis e considerados de boa qualidade.

Os valores de pH observados para silagens confeccionadas com 100% de forragem de guandu, confirmam a hipótese da ocorrência de degradação de proteína bruta, evidenciando a existência de fermentações indesejáveis (butíricas), para a conservação da silagem. Esse aumento já era esperado, pois segundo Eichelberger et al. (1997b), a mistura de leguminosa com gramínea tende a aumentar o pH da silagem pelo maior poder-tampão da leguminosa.

Os resultados referentes à capacidade tampão (CT) das silagens com mistura de forragem de guandu estão apresentados na Tabela 5. No presente trabalho, observou-se resposta quadrática desta variável em função do aumento nos níveis de inclusão guandu na silagem de sorgo (Figura 12).

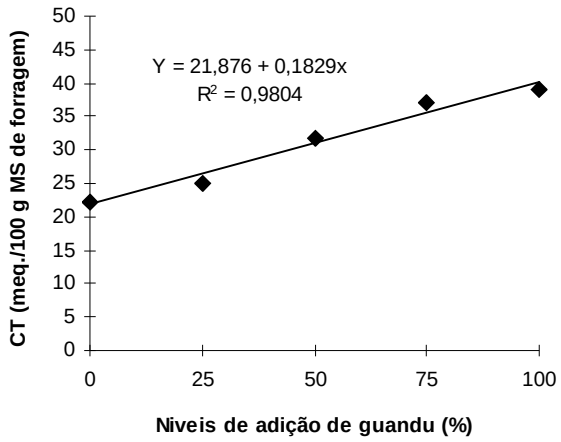

Figura 12 - Efeito de níveis de inclusão de guandu para os resultados da capacidade tampão (meq./100 g MS de forragem) da silagem de sorgo

Do nível 0 de inclusão ao 100%, houve uma variação de 22 a 39 eq.mg HCl/100 g MS, correspondendo a um aumento de 86,36%. A capacidade tamponante é medida por meio da quantidade em meq de H^+ que é gasta para abaixar os valores de pH de 6 até 4 de uma forragem, indicando a resistência dos componentes orgânicos e inorgânicos à acidificação, durante a conservação (McDONALD et al., 1991). Uma característica das leguminosas é o baixo conteúdo de carboidratos solúveis e alto poder-tampão promovido por aminoácidos residuais e presença de cátions K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+}, que neutralizam os ácidos orgânicos formados pela fermentação, impedindo a queda do pH LIMA et al. (2008).

Também a resposta dos níveis de guandu sobre os teores de ácido lático foi do tipo quadrático ($P<0,01$), com menor concentração para o ácido lático obtida com 100% de inclusão de guandu (Figura 13). Entretanto, as silagens com os tratamentos 25, 50 e 75% de inclusão de guandu apresentaram valores acima de 3,95% de ácido lático, o que caracteriza uma silagem de boa qualidade.

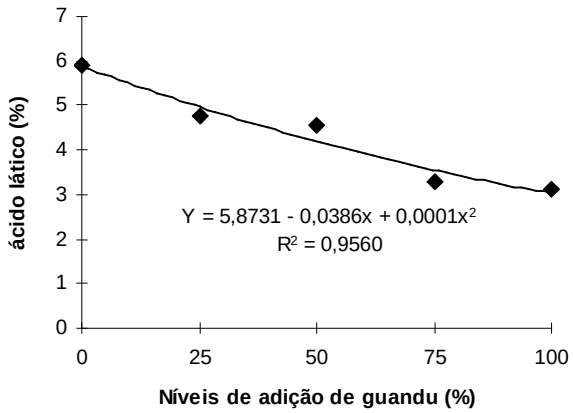

Figura 13 - Efeito de níveis de inclusão de guandu nos teores ácido lático (%) da silagem de sorgo

Por outro lado, houve decréscimo do ácido lático à medida que aumentaram os níveis de guandu de (5,92 a 3,10%), o que também foi encontrado por Pereira et al. (2004), quando avaliaram o efeito sobre a composição química de milho misturado com leucena, obtendo efeito negativo sobre a qualidade das silagens.

As perdas de matéria seca foram maiores (P<0,01) à medida que se aumentou o nível de inclusão de guandu na silagem. No estudo de regressão, constatou-se diferença significativa linear crescente quando se utilizou a forragem de guandu (Figura 14). Estes resultados podem ser explicados observando-se o pelo efeito decrescente nos teores de MS.

A perda de nutriente está associada à presença de efluente dentro do silo, que é indesejável, devendo ser evitado para não prejudicar o processo fermentativo. A matéria seca da massa ensilada sofre conseqüentes modificações que podem alterar o curso dos processos fermentativos durante a ensilagem, afetar a sua qualidade e favorecer o crescimento de bactérias clostrídicas, aumentando a proteólise e modificando o perfil fermentativo de ácidos orgânicos (SOUZA et al., 2003). Durante o processo fermentativo, outra importante forma de perda é a devido à formação de gases e ao tipo de fermentação ocorrido no processo (MACEDO, (2006).

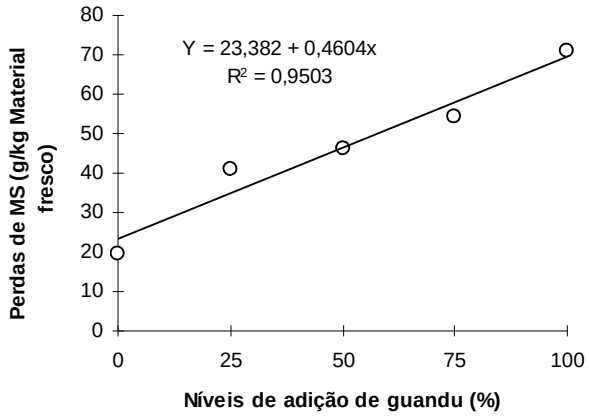

Figura 14 - Efeito de níveis de inclusão de guandu para as perdas de MS durante a fermentação (g/kg MS) da silagem de sorgo

Na Tabela 6 é apresentado um resumo das observações quanto ao efeito da adição de guandu na ensilagem de sorgo sobre o perfil fermentativo das silagens

Tabela 6. Perfil fermentativo das silagens.

Variáveis	Níveis de guandu (%)					Média	CV	Probabilidade	
	0	25	50	75	100			L	Q
pH	3,7	3,8	3,9	4,0	4,9	4,1	3,1	0,0001	0,0001
CT	22,1	25,1	31,6	35,1	39,0	31,0	2,4	0,0001	0,0001
Perdas	19,6	41,1	46,4	54,0	70,7	46,4	2,8	0,0001	ns
Ac-lático	5,9	4,7	4,5	3,2	3,1	4,3	5,7	ns	0,0001

pH: potencial hidrogeniônico; CT: capacidade tampão (meq./100 g MS forragem); Perdas: perdas de matéria seca (g/kg MS); Ác-lático: ácido lático (%); CV: coeficientes de variação (%); ns: não-significativo; L: probabilidade para o efeito linear; Q: probabilidade para o efeito quadrático.

3.4 CONCLUSÕES

Concluiu-se que a adição de guandu na ensilagem de sorgo aumentou o conteúdo de PB e reduziu os teores de FDN, implicando em melhor valor nutritivo das silagens, podendo ser recomendada a adição de até 75% de guandu na ensilagem. Níveis superiores de guandu no momento da ensilagem podem comprometer o perfil fermentativo ou o valor nutritivo. Os resultados de TC estudados nas silagens apresentaram teores aceitáveis e pode ser incorporado à dieta dos ruminantes.

4 AVALIAÇÃO DAS SILAGENS DE SORGO COM ADIÇÃO DE NÍVEIS CRESCENTES DE GUANDU PELA TÉCNICA *IN VITRO* SEMI-AUTOMÁTICA DE PRODUÇÃO DE GASES

Resumo

A planta de sorgo, devido à facilidade de cultivo, altos rendimentos e produção de silagem de boa qualidade, é uma das espécies mais adaptadas à produção de silagem. O sorgo pode apresentar ou não a presença de taninos, compostos fenólicos de alto peso molecular, que apresentam a habilidade de formar ligações efetivas com proteínas e outras moléculas. Entretanto, os efeitos da presença destas substâncias em dietas dos ruminantes, na maioria das vezes são negativos, observando-se a diminuição na palatabilidade, digestibilidade da proteína, taxas de ganho de peso e produção de leite. O polietileno glicol (PEG) possui a capacidade de ligar-se aos taninos, reduzindo seus efeitos deletérios à digestão e proporcionando uma maior disponibilidade do substrato para a fermentação ruminal. O objetivo do presente ensaio foi avaliar a produção total de gases, a produção de metano, a degradabilidade da matéria seca (DMS) e da matéria orgânica (DMO), usando a técnica *in vitro* de produção de gases de silagem de sorgo granífero com adição de guandu. Para medir o possível efeito do tanino presente nas silagens, foi utilizado o PEG para quantificar o incremento na produção de gás e de metano. Observou-se que na presença do PEG no substrato que tinha 25% de guandu a produção de gases foi maior ($P<0,01$) em comparação com o sem PEG; enquanto que para a produção de metano, o substrato com 50 % de guandu apresentou maior produção ($P<0,01$) com o PEG. Quanto aos incrementos de produção de gases e metano, os resultados foram muito variados, havendo maior incremento de produção de gases no substrato com 25% de guandu e para o metano maior incremento no substrato com 50% de guandu. As variáveis DMS e DMO aumentaram à medida que aumentou os níveis de guandu na silagem de sorgo, sendo maiores essas variáveis quando foi adicionado o PEG em relação ao sem PEG. A avaliação das silagens estudadas mostrou que o teor de tanino presente pode interferir na fermentação *in vitro* e produção de metano, conforme observado quando os substratos foram incubados na presença do PEG.

Palavras-chave: taninos, polietileno glicol, produção de gases, metano, fermentação ruminal

IN VITRO EVALUATION OF SORGHUM SILAGE WITH ADDITION OF INCREASING LEVELS OF GUANDU USING SEMI-AUTOMATIC GAS PRODUCTION TECHNIQUE

Abstract

The sorghum crop is one of the most suitable crops for silage production due to facility of cultivation with higher yields and to produce good quality silage. Sorghum can have tannins and phenolic compounds of high molecular weight, which have the ability to form effective links with proteins and other molecules. However, in most cases, the antinutritional effect of the presence of these substances in the ruminants' diets appears to reduce palatability, protein digestibility, weight gain and milk production. Addition of polyethylene glycol (PEG) could reduce their deleterious effects on digestion because of its ability to bind to tannins, and providing greater availability of substrate to the rumen fermentation. The objective of this study was to evaluate the sorghum silage with the addition of guandu using *in vitro* semi automated gas production technique. Total gas production, methane production, the dry matter degradability (DMD) and organic matter (OMD) were estimated. PEG was used to measure the possible effect of tannins of sorghum silage on methane and gas production. The results indicated that the presence of PEG in the sorghum silage in the level of 25% and 50% inclusion of guandu were the highest ($P < 0.05$) in the gas and methane production, respectively compared with the other levels. For the gas and methane production increment, the results varied, the highest ($P < 0.01$) increment of gas production and methane production were found with the levels of 25% 50% inclusion of guandu, respectively. DMD and OMD increased with the increasing of pigeon pea levels with sorghum silage, these variables were greater ($p \leq 0.01$) when PEG was added compared to without PEG. This evaluation of the silages showed that the presence of tannin in sorghum silage can interfere in the rumen fermentation and methane production *in vitro* especially identified when the substrates were incubated in the presence of PEG.

Keywords: tannins, polyethylene glycol, gas production, methane, ruminal fermentation.

4.1 INTRODUÇÃO

O sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) é uma das plantas forrageiras mais adaptada ao processo de ensilagem, por sua facilidade de cultivo e alto rendimento, além de não haver necessidade de aplicação de aditivos para estimular a fermentação (NEUMANN et al., 2002). Apresenta ainda uma importante característica de manter vivo o seu sistema radicular após a colheita para ensilagem, o que possibilita a utilização da rebrota, sendo capaz de produzir até 60% da matéria seca do primeiro corte. Entretanto, a silagem de sorgo apresenta um baixo teor de proteína o que constitui uma limitação ao seu uso, principalmente para animais de altas exigências nutricionais (EVANGELISTA et al., 2005). Uma alternativa para melhorar o valor nutritivo desta silagem, é a inclusão da forragem de guandu no momento da ensilagem, principalmente para proporcionar aumento no teor de proteína bruta.

O guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) vem sendo utilizado em diversas regiões brasileiras para diferentes propósitos, mais freqüentemente, porém, na alimentação animal, tanto como pastagem exclusiva ou consorciada, como também, na forma de forragem verde, feno e componente de mistura de silagem (FAVORETTO et al., 1995).

Para Phatak et al. (1993) a utilização do feijão guandu como espécie forrageira é ideal como fonte de proteína barata e pode substituir outras fontes de alimentação animal, com elevados rendimentos de proteína bruta.

No Brasil, muitas são as forrageiras usadas na alimentação de ruminantes que apresentam elevado teores de taninos. Entretanto, os efeitos da presença destas substâncias em dietas dos ruminantes, na maioria das vezes são negativos, observando-se a diminuição na palatabilidade, digestibilidade da proteína, taxas de ganho de peso e produção de leite (MAGALHAÊS; RODRIGUES; DURÃES, 2003).

A avaliação *in vitro* de plantas ricas em taninos pode ser realizada utilizando o polietileno glicol (PEG) como agente complexante de tanino condensado no pH do rúmen (MAKKAR; BLUMMEL; BECKER, 1995). Segundo Makkar (2003), o PEG possui o potencial de aumentar a utilização de dietas contendo alto teor de taninos, sendo também responsável pela quebra de complexos tanino-proteína, em função de sua maior afinidade pelos taninos do que as proteínas.

O bioensaio, metodologia desenvolvida por Makkar, Blummel e Becker (1995), tem como base o uso do PEG na determinação dos efeitos dos taninos condensados na produção de gases *in vitro*. A afinidade das moléculas de taninos pelo PEG resulta em acréscimos na produção de gases e, por meio de diferenças, é possível avaliar a atividade dos taninos presentes nos alimentos (BUENO et al., 2008).

Segundo Theodorou et al. (1994), a técnica de "produção de gases *in vitro*", tem demonstrado ser uma opção viável para avaliação do valor nutritivo e digestibilidade dos alimentos usados nas dietas e para estimar a produção de CH_4. A grande vantagem desta metodologia é a praticidade de se medir a produção de gases, com o uso de um transdutor e a pequena quantidade necessária de material para um ensaio. Através da simulação *in vitro* do ambiente ruminal, a técnica permite além de mensurar a o desaparecimento de material no decorrer do tempo, através da quantificação dos resíduos após a incubação, está técnica também mede a formação de subprodutos (gases) da ação microbiana durante o processo de degradação (BUENO, 2005).

Getachew et al. (2005) utilizaram satisfatoriamente a metodologia *in vitro* de produção de gases para estimar a produção de metano em dietas para vacas leiteiras. Longo et al. (2006) adequaram a metodologia descrita por Bueno et al. (2005) para as necessidades de quantificar o metano produzido por plantas taniníferas pela técnica *in vitro* de produção de gases semi-automatica. Jayanegara et al. (2009), utilizaram o PEG em bioensaio para avaliar o potencial de mitigação de metano em plantas taniníferas e concluíram que o teor de tanino nos substratos taniníferos teve efeito significativo sobre a produção de metano e que existe uma correlação entre o teor de tanino e a produção de metano que pode ser estimada pelo bioensaio proposto.

O objetivo do presente ensaio foi avaliar a produção total de gases, a produção de metano, a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica, usando a técnica *in vitro* de produção de gases de silagem de sorgo granífero com adição de guandu.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local do experimento

O cultivo do sorgo e do guandu e o preparo das silagens foram realizados nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), Piracicaba, SP. A descrição dos procedimentos é apresentada no capítulo 3 deste trabalho.

4.2.2 Tratamentos e processamento das amostras

Os substratos avaliados referem-se a silagem de sorgo (T0) e silagens com inclusão de guandu em níveis crescentes (25, 50 e 75%; respectivamente T25, T50 e T75). A secagem das silagens foi realizada por liofilização por um período de 72 horas, sendo a água removida por sublimação a -40°C, com a finalidade de garantir a preservação dos nutrientes do material. Posteriormente o material foi moído em moinho com peneira perfurada com diâmetros de 1 mm. Em seguida foram armazenadas em frascos de vidro, com tampas e mantidas secas e ao abrigo de luz direta.

Para a avaliação *in vitro*, foram separados 20 substratos correspondentes a cada um dos silos preparados (silagem de sorgo mais cinco níveis de adição de guandu; e quatro repetições por tratamento).

4.2.3 Bioensaio *in vitro* de produção de gases na presença de polietileno glicol (PEG)

Foi adotada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases e bioensaio proposta por Maurício et al. (1998) e adaptada por Bueno et al. (2005) às condições do LANA-CENA/USP. Para medir o efeito do tanino presente nas silagens, foi utilizado o polietileno glicol (PEG), conforme procedimentos propostos por Bueno et al. (2008) e Longo et al. (2006).

4.2.3.1 Frascos de fermentação

A incubação foi feita em 98 frascos de vidro com capacidade para 160 mL que previamente ao experimento foram lavados com água destilada, secos e identificados. Foram utilizados 16 frascos para cada substrato, sendo oito com PEG e oito sem PEG, quatro frascos de brancos (frascos contendo apenas o meio de cultura e o inoculo, dois com e dois sem PEG) e mais quatro frascos com substrato padrão do LANA, utilizando como padrão interno entre corridas. Em cada frasco foram adicionados 500 mg de substrato (silagem de sorgo com diferentes níveis de guandu). Nas garrafas com PEG, além do substrato adicionou-se 500 mg de PEG (PEG 6000, Merk, Germany) em cada frasco para medir o efeito dos taninos na fermentação de acordo com Makkar, Blümmel e Becker (1995), em seguida, foram adicionados manualmente, utilizando uma proveta, 50 mL de meio de cultura conforme descrito em Theodorou et al. (1994) e Bueno et al. (2005). Os frascos foram vedados com rolhas de borracha (14 mm) para evitar perda de gases e colocados na estufa a 39°C até o momento da inoculação.

4.2.3.2 Meio de cultura

O meio de cultura era composto por solução tampão de carbonato de amônio e bicarbonato de sódio (1186,17 mL); solução de macrominerais com fosfato de sódio, fosfato de potássio e sulfato de magnésio (1186,17 mL); solução de microminerais com cloreto de cálcio, cloreto de manganês, cloreto de cobalto e cloreto ferroso (50 mL); solução de rezasurim 0,1% (100 mL) e solução redutora de cisteína, hidróxido de sódio 1M e sulfito de sódio (355,68 mL), conforme descrito por Theodorou et al. (1994). Este foi agitado constantemente e saturado com CO_2 por duas horas até atingir coloração rosada, sendo então adicionados 50 mL desta solução em cada frascos de fermentação com auxílio de uma proveta.

4.2.3.3 Preparo do inóculo e inoculação

Três ovinos machos castrados da raça Santa Inês foram utilizados como doadores de líquido ruminal, providos de cânula permanente de rúmen e

alimentados a pasto com suplementação diária de 500 g de concentrado a base de grão de milho e farelo de soja, aproximadamente 180 g de proteína bruta por kg de matéria seca consumida.

Para o preparo do inoculo, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram coletadas separadamente com auxílio sonda acoplada a seringa e pinça, sendo misturadas na proporção de 50% de cada material. Após transporte em frascos mantidos livre de oxigênio, no laboratório o material foi homogeneizado em um liquidificador por 10 segundos, para recuperação dos microrganismos celulolíticos que se aderem fortemente à fração sólida.

O material resultante foi filtrado em três camadas de tecido de algodão (fralda). As frações filtradas foram misturadas e mantidas em banho-maria a 39°C, com dióxido de carbono insuflado continuamente. A inoculação foi realizada através da injeção de 25 mL de inóculo em cada frasco de incubação usando seringa plástica graduada. Os frascos foram tampados e após a inoculação os frascos foram agitados manualmente, e em seguida incubados em estufa a 39°C. Este foi considerado tempo zero e dando início à contagem dos tempos de fermentação.

4.2.3.4 Medição de gases

As leituras de pressão geradas pelos gases acumulados em cada frasco de fermentação foram feitas utilizando um “transdutor” medidor de pressão conectado a uma agulha (25 mm x 7 mm) (THEODOROU et al., 1994), nos tempos de 6, 14 e 24 horas após a inoculação dos substratos, sendo a leitura realizada por um leitor digital e registrada na memória do equipamento (PDL800, LANA/CENA-USP, Piracicaba/SP). Após a leitura, com o auxílio de seringa plástica de 10 mL acoplada ao transdutor, uma alíquota do gás produzido foi retirada para posterior quantificação de metano. O restante do gás no interior do frasco foi liberado até a indicação da pressão pelo transdutor acusar valor igual a 0,53 (linha basal do equipamento) e rapidamente a agulha com o “transducer” foram retirados.

Os dados de pressão foram utilizados para o cálculo da produção total de gases produzidos calculados através de equação para conversão de pressão em volume desenvolvida no LANA para as condições climáticas de Piracicaba - São Paulo e o equipamento utilizado (PDL800):

$PTG = -0,053p^2 + 7,335p$ ($r^2 = 0,99$)

Onde: PTG = produção total de gases (mL/g MS) e P = pressão (psi).

4.2.3.5 Coleta e determinação de metano (CH_4)

Para análise do gás metano (CH_4), foram coletados três amostras (3, 3 e 4 mL) do gás produzido em cada frasco nos tempos de leitura de 6, 14 e 24 horas com auxílio de seringas descartáveis e armazenadas em tubo de ensaio de 10 mL previamente submetidos a vácuo até atingir uma pressão de 1000 Mbar.

O gás metano (CH_4) foi determinado em cromatógrafo a gás (Chimadzu GC2014) usando como padrão o gás metano (99%), com detector a 240°C e coluna Shincarbon a 60°C.

O volume de metano produzido foi calculado conforme descrito em Longo et al. (2006) para as condições do ensaio:

$$CH_4 \text{ (mL/g MS)} = (PTG_{24h} + 85) \times [CH_4]$$

Onde: CH_4 = emissão de metano 24 h (mL/g MS); PTG_{24h} = produção total de gases em 24 horas (mL/g MS); 85 = volume do espaço vazio dentro do frasco e $[CH_4]$ = concentração de metano em %.

4.2.3.6 Incremento de gás na presença do PEG (bioensaio)

Os incrementos na produção de gases e de metano na presença do PEG para cada tratamento foram determinados segundo metodologia descrita por Jayanegara et al. (2008):

$$\text{Incremento gás (\%)} = \frac{[(PGT_{24h} \text{ com PEG} - PGT_{24h} \text{ sem PEG})]}{PGT_{24h} \text{ sem PEG}} \times 100$$

$$\text{Incremento } CH_4 \text{ (\%)} = \frac{[(CH_4 \text{ com PEG} - CH4 \text{ sem PEG})]}{CH4 \text{ sem PEG}} \times 100$$

Onde: PTG_{24h} com PEG é a produção líquida de gás (mL) em 24 hs dos substratos com a adição de PEG e PTG_{24h} sem PEG é a produção líquida de gás (mL) em 24 hs dos substratos sem a adição de PEG; e respectivamente, CH_4 com PEG e CH_4 sem PEG é a produção líquida de metano (mL) em 24 hs dos substratos com e sem a adição de PEG. Produção líquida de gás ou de metano é o volume produzido pelo substrato, descontado do volume produzido pelo branco.

4.2.3.7 Degradabilidades da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO)

Os resíduos da fermentação ruminal após 24 horas foram obtidos por meio da filtragem em cadinhos de vidro com placas de porcelana porosa de peso previamente conhecido. Os resíduos foram secos em estufa a 105°C durante 24 horas e pesados para que fossem calculados os valores de degradabilidade da matéria seca (DMS) por diferença de pesos em relação ao peso seco do substrato inicial (g/kg MS). Os cadinhos com resíduo de matéria seca foram levados para mufla a 500°C durante 4 horas para determinação da matéria mineral, que foi utilizada para determinar a degradação da matéria orgânica (DMO) por diferença de pesos em relação à matéria orgânica do substrato inicial.

4.2.4 Delineamento e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado. Estudaram-se cinco tipos de silagens (0, 25, 50, 75 e 100%) aos níveis de inclusão do guandu a silagem de sorgo, utilizados como substratos para verificar o efeito dos taninos presente nas silagens quando adicionado o PEG na produção de gases, metano, DMS e DMS através dos incrementos. Foi realizada a análise de variância e regressão polinomial utilizando o PROC GLM do programa estatístico SAS (SAS, 2000). A escolha dos modelos foi baseada na significância dos efeitos em linear, quadrático, cúbico e desvios da linearidade ao nível de 1% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Bioensaio de produção de gases

O bioensaio foi avaliado através dos acréscimos de produção de gases e produção de metano das amostras de silagens utilizadas como substratos incubadas com a presença do PEG em 24 horas. Os resultados são apresentados na Tabela 7. Não houve diferença significativa (P>0,01) na produção de gases com e sem a presença do PEG.

Por outro lado, quando testado o contraste 0 x média de 25, 50, 75 e 100% foi observada diferença significativa linear decrescente (P<0,01) como observado na Figura 15.

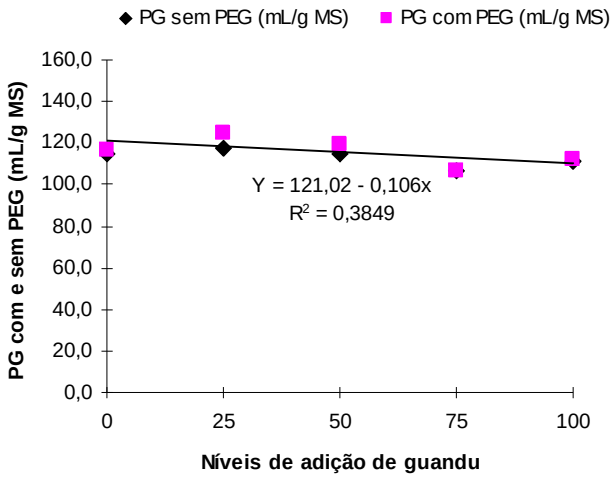

Figura 15 - Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da produção de gases sem e com a presença do PEG (mL/g MS) nos substratos incubados

Tabela 7 - Médias de produção de gases (PG 24h), metano (CH_4) e incrementos (%) das silagens usados como substratos na presença do PEG após 24 horas de incubação.

Variáveis	PEG	Níveis de guandu (%)					Média	CV[1]	Probabilidade[2]				Contraste[3]
		0	25	50	75	100			L	Q	C	Desvio	
PG 24h (mL/g MS)	sem	114,8	117,6	114,9	106,3	111,0	112,9	5,2	ns	ns	ns	ns	0,0008
	com	116,4	124,4	119,1	106,7	112,0	115,7	4,1	ns	ns	ns	ns	
Incremento (%)		1,4	5,8	3,7	0,4	0,9	2,5	253,4	ns	ns	ns	ns	ns
CH4 24h (mL/g MS)	sem	17,3	19,4	23,4	19,9	18,5	19,7	19,5	ns	ns	ns	ns	0,0023
	com	18,8	21,4	26,8	22,6	20,5	22,0	16,8	ns	ns	ns	ns	
Incremento (%)		8,7	10,0	14,7	13,4	10,6	11,7	178,3	ns	ns	ns	ns	ns

[1]Coeficientes de variação (%).
[2]Probabilidade: L = probabilidade para o efeito linear; Q = probabilidade para o efeito quadrático; C = probabilidade para o efeito cúbica; Desvio = probabilidade para o efeito de desvio da linearidade.
[3]Contraste: sem x com PEG = 0% x média de 25, 50, 75 e 100%.
ns = não significativo.

Para a porcentagem de incremento na produção de gases após 24 horas de incubação das silagens incubadas na presença do PEG, a análise de regressão não detectou diferença significativa (P>0,01) para os incrementos, mesmo após realizado o contraste entre os níveis.

A produção acumulada de metano em 24 horas, assim como na variável discutida anteriormente de PG, a análise de regressão não detectou (P>0,01) qualquer influencia sem e com adição do PEG nos substratos utilizados.

Houve diferença significativa quadrática quando foi aplicado o contraste dentro de cada nível. Após 24 horas de incubação, a produção de metano foi maior em 50% de guandu quando adicionado o PEG, em quanto a incubação com 0, 25, 75 e 100% apresentaram menores valores, Figura 16.

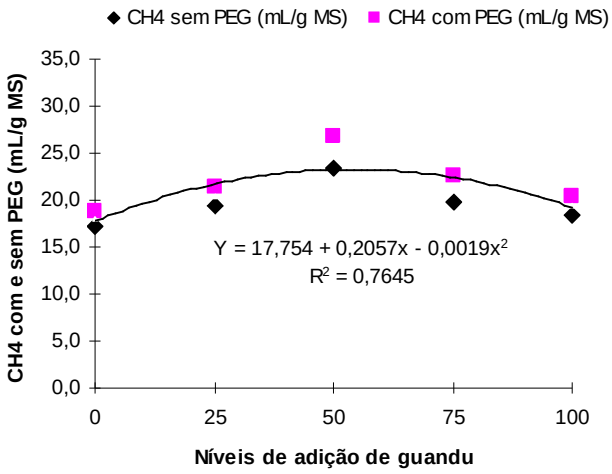

Figura 16 - Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da produção de CH_4 sem e com a presença do PEG (mL/g MS) dos substratos incubados

Os resultados observados na produção de metano estão de acordo com os resultados de Jayanegara et al. (2009) que houve maior produção de metano quando foi adicionado o PEG nos diferentes susbtratos estudados após 24 horas de fermentação.

4.3.2 Degradabilidade ruminal *in vitro* da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO)

A Tabela 8 apresenta as médias dos parâmetros de DMS em 24 horas dos substratos utilizados sem e com a presença do PEG. A análise de regressão não detectou qualquer efeito significativo para essa variável. Embora por meio do contraste também não foi detectado qualquer efeito significativo em cada um dos níveis estudados quando adicionado o PEG.

Houve aumento da DMS à medida que se aumentaram os níveis de guandu. Pode-se notar que quando foi adicionado o PEG nos substratos estudados apresentaram valores de DMS superiores em relação ao sem PEG, indicando uma maior ação do PEG sobre os taninos, disponibilizando maiores quantidades de substrato, nas 24 horas de degradação. Cabral Filho (2004) trabalhando com a mesma cultivar de sorgo granífero BR 306 encontraram valores de DMS nos grãos *in natrura* (830 g/kg MS), valores estes superiores aos encontrados no presente experimento.

Godoy (2006) trabalhando com a forragem fresca *in natura* de guandu encontraram menores valores de DMS (269 g/kg MS) quando comparado com o presente experimento.

Lima et al. (2008), avaliando a digestibilidade de nutrientes na silagem de sorgo com níveis crescentes (0, 25, 50, 75 e 100) de girassol encontraram valores de 545,9; 516,8; 561,6; 559,9 e 543,5g/kg MS, sendo estes valores semelhantes aos encontrados nesse experimento.

Assim, pode-se sugerir que o aumento verificado na DMS nas silagens com mistura de até 100% de guandu ocorreu possivelmente pela maior disponibilidade de nitrogênio nos substratos estudados, devido ao maior conteúdo de PB da forragem de guandu utilizada, o que levaria à maior degradabilidade do alimento, conforme encontrado por Carvalho (2008).

Tabela 8 - Médias de degradabilidade ruminal da matéria seca (DMS) e matéria orgânica (DMO) das silagens usados como substratos na presença do PEG após 24 horas de incubação.

Variáveis	PEG	Níveis de guandu (%)					Média	CV[1]	Probabilidade[2]				Contraste[3]
		0	25	50	75	100			L	Q	C	Desvio	
DMS 24h (g/kg MS)	sem	531,0	551,3	553,5	554,5	622,6	562,6	7,2	ns	ns	ns	ns	ns
	com	575,2	575,2	582,7	588,3	648,9	594,0	10,4	ns	ns	ns	ns	
DMO 24h (g/kg MS)	sem	522,3	548,1	536,0	541,0	619,3	553,3	7,8	ns	ns	ns	ns	0,0150
	com	567,4	546,6	549,9	556,8	622,8	568,7	10,1	ns	ns	ns	ns	

[1]Coeficientes de variação (%).
[2]Probabilidade: L = probabilidade para o efeito linear; Q = probabilidade para o efeito quadrático; C = probabilidade para o efeito cúbico; Desvio = probabilidade para o efeito de desvio da linearidade.
[3]Contraste: sem x com PEG = 0% x média de 25, 50, 75 e 100%.
ns = não significativo.

Para os resultados da DMO dos substratos a análise não detectou diferença significativa sem e com a presença do PEG em cada um dos substratos (Tabela 8). Quando comparados pelo teste de contraste 0% x média de 25, 50, 75 e 100% de guandu a análise de regressão encontrou diferença significa do tipo quadrática (P<0,01) Figura 17.

O PEG proporcionou um maior aumento na DMO quando comparado sem a presença do PEG, a exceção do substrato com 25% de guandu que foi observado um valor menor.

Godoy (2006) também utilizando o guandu como forragem na alimentação de ovinos, observou menores valores de DMO (271 g/kg MS) do que mostrou a silagem de guandu neste estudo (553 g/kg MS) após 24 horas de incubação.

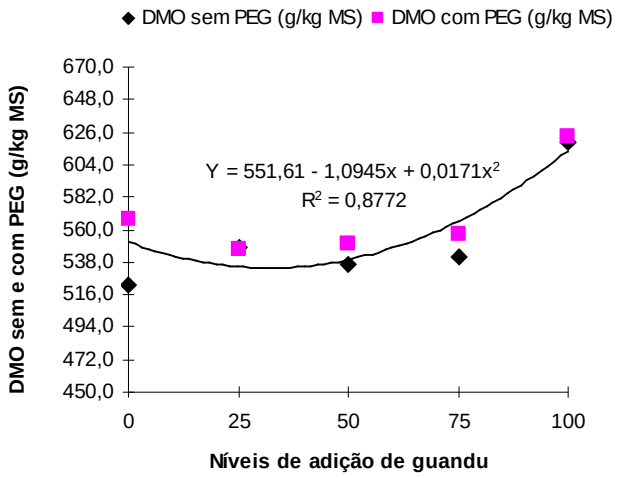

Figura 17 - Representação gráfica da equação de regressão para os resultados do contraste da DMO (g/kg MS) sem e com a presença do PEG nos substratos incubados.

4.4 CONCLUSÕES

A produção de gases no substrato utilizado com 25% de guandu com a presença do PEG foi maior, levando a acreditar que houve maior complexação do PEG com os taninos. Também aumentou a produção de CH4 no substrato utilizado com 50% de guandu e redução com 75 e 100% de guandu. O substrato utilizado com 25% de guandu possivelmente poderia ser incluído na dieta de ruminantes com a finalidade de suplementação protéica e na mitigação de metano por ter menor emissão da mesma e menor incremento.

As variáveis de DMS e DMO foram maiores com a presença do PEG nos substrato com 100% de guandu.

Em geral os taninos encontrados nas silagens podem influenciar negativamente a fermentação ruminal e consequentemente a degradabilidade, devendo levar em consideração o tipo de tanino e sua estrutura, apesar de não estar ainda bem esclarecido na literatura de que forma as diferentes estruturas ou composição dos monômeros afetam sua atividade biológica.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A planta de guandu pode ser adicionada ao sorgo para ensilar, proporcionando valores nutritivos satisfatórios até o nível de 75% de mistura.

Na produção de gases, o tanino teve pouco efeito conforme demonstrado com a adição do PEG nos diferentes substratos estudados, devido aos baixos teores de taninos encontrados nas silagens e indicando ser reduzida a influencia destes taninos sobre a fermentação ruminal.

Mais estudos devem ser realizados com essas dietas, principalmente estudos *in vivo*, uma vez que essas silagens apresentaram baixos teores de taninos condensados dentro da faixa considerada de segurança para alimentação animal.

REFERÊNCIAS

AGANGA, A. A.; MONASE, K. W. Tannin content, nutritive value and drymatter digestibility of *Lonchocarpus capasa*, *Zizyphus mucronata, Sclerocarya birrea, Kirkia acuminate* and *Rhus lancea* seeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, p. 107-113, 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995.

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

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

BERNARDINO, M. L. A.; RODRIGUEZ, N. M.; SANTANA, A. A. C. Influência dos taninos sobre a fração de nitrogênio amoniacal e DIVMS em híbridos de sorgo de porte médio de colmos suculentos e secos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 31., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBZ, 1996. p. 443-445.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E.R. Comparison of *in vitro* and nylon bag degradability of roughages in predicting feed iontake cattle. **Animal Feed Science and Technology**, v.40, n.2, p.109-119, 1994

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

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

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**, Amsterdam, v. 141, p. 153-170, 2008.

CABRAL FILHO, S. L. S. **Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais de ovinos**. 2004, 88 f. Tese (Doutorado em Ciência) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

CÂNDIDO, M. J. D.; OBEID, J. A.; PEREIRA, O. G.; CECON, P. R.; QUEIROZ, A. C.; PAULINO, M. F.; GONTIJO NETO, M. M. Valor nutritivo de silagens de híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) sob doses crescentes de adubação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 20-29, 2002.

CARVALHO, D. D.; ANDRADE, J. B.; BIONDI, P. Estádio de maturação na produção e qualidade da silagem de sorgo: Produção de matéria seca e de proteína bruta. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 49, n. 2, p. 91-99, 1992.

CARVALHO, W. T. V.; GONÇALVES, L. C.; MAURÍCIO, R. M.; SOUZA, L. F.; VEIGA, I, R. F. M.; MOREIRA, G. H. F. A. Avaliação do polietileno glicol (PEG) sobre a cinética de fermentação ruminal e a degradabilidade da matéria seca e matéria orgânica de grãos de sorgo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ; UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

CASTRO, O. P. C. M.; RÊGO, M. M. T.; AGUIAR, E. M.; MELO, A. B.; MACIEL, F. C.; LÔBO, R, N. B.; LIRA, M. A. Composição bromatológica da silagem de sorgo com níveis crescentes de girassol. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2008, Aracajú. **Anais…** Aracajú: SNPA, 2008. 1 CD-ROM.

CUMMINS, D. G. Relationships between tannin content and forage digestibility in sorghum. **Agronomy Journal**, Madison, v. 63, p. 500-502, 1971.

DAHIYA, S. S.; CHAUHAN, Y. S.; JOHANSEN, C.; WALDIA, R. S.; SEKHONS, H. S.; NANDAL, R. S. Extra-short-duration pigeon pea for diversifying wheat - based cropping systems in the sub-tropics. **Experimental Agriculture**, London, v. 38, p. 1-11, 2002.

DIAS, A. M. A.; BATISTA, A. M. V.; FERREIRA, M. A.; LIRA, M. A.; SAMPAIO, I. B. M. Efeito do estádio vegetativo do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) sobre a composição química da silagem, consumo, produção e teor de gordura do leite para vacas em lactação, em comparação à silagem de milho (*Zea mays*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 2086-2092, 2001.

DIAS, F. J. **Valor nutritivo de silagens de gramíneas de inverno com ou sem leguminosas e da planta de soja**. 2007. 83 f. Tese (Doutorado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

D'MELLO, J. P. F. Anti-nutritional substances in legumes seeds. In: D'MELLO, J. P. F.; DEVENDRA, C. (Ed.). **Tropical legumes in animal nutrition**. Wallingford. CAB International, 1995. cap. 6, p. 135-172.

DUBOIS, M.; GUILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1966.

EICHELBERGER, L.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Efeitos da inclusão de níveis crescentes de forragem de soja e uso de inoculante na qualidade da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 667-674, 1997a.

EICHELBERGER, L.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P. Efeitos da inclusão de soja ou feijão miúdo e uso de inoculante na qualidade da silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 26, n. 4, p. 667-674, 1997b.

ERWING, W. S.; MARCO, G. J.; MERY, E. M. Volatile fatty acids analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 44, n. 9, p. 1768-1771, 1961.

EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G.; AMARAL, P. N. C.; PEREIRA, R. C.; SALVADOR, F. M.; LOPES, J.; SOARES, L. Q. Composição bromatológica de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) aditivadas com forragem de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) Dewit). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 2, p. 429-435, 2005.

FAVORETTO, V.; PAULA, G. H.; MALHEIROS, E. B.; GUIDELI, C. Produção e qualidade da forragem aproveitável de cultivares de guandu durante o período seco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 7, p. 1009-1015, 1995.

FERNANDES, F. D.; AMABILE, R. F.; FALEIRO, F. G.; RAMOS, A. K.; GODOY, R. **Avaliação agronômica de genótipos de guandu no Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 13 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**,** 168).

FLARESSO, J. A.; GROSS, C. D.; ALMEIDA, E. X. Cultivares de milho (*Zea mays* L.) e sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) para ensilagem no Alto Vale do Itajaí, Santa Catarina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 1608-1615, 2000.

FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; RAMOS, G.; GIRÁLDEZ, F.J.;MANTECÓN, A.R. Condensed tannin content of several shrub species fromamountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 92, p. 215-226, 2002.

FUKUSHIMA, R. S. Otimização de método analítico para a determinação do teor de lignina. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 1., 2007, Pirassununga. Pirassununga: FZEA/USP, 2007. p. 253-279.

GARCIA, C. A.; MORGATO, A. C.; SPERS, R. C.; GUALBERTO, R.; LIMA, G. O.; SURGE, C. A. Feno de *Cajanus cajan* (feijão guandu) e *Tithonia diversifolia* (girassol mexicano) para cordeiros alimentados em comedouros privativos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ; UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

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

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

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J. Relationship between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 111, n. 1-4, p. 57-71, 2004.

GETACHEW, G.; ROBINSON, P. H.; DePETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; GISI, D. D.; HIGGINBOTHAM, G. E.; RIORDAN, T. J. Methane production from commercial dairy rations estimated using an *in vitro* gas technique. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 391-402, 2005.

GODOY, P. B. **Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras**. 2007. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

GONÇALVES, L. C.; RODRIGUEZ, N. M.; NOGUEIRA, F. S.; BORGES, A. L. C. C.; ZAGO, C. P. Silagem de sorgode porte baixo, com diferentes teores de tanino e de umidade no colmo. III - Quebra de compostos nitrogenados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 51, p. 571-576, 1999.

GUIMARÃES-BEELEN, P. M.; BERCHIELLI, T. T.; BEELEN, R.; MEDEIROS, A. N. Influence of condensed tannins from Brazilian semi-arid legumes on ruminal degradability, microbial colonization and ruminal enzymatic activity in Saanen goats. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v. 61, p. 35-44, 2006.

HAHN, D. H.; ROONEY, L. W. Effect of genotype on tannins and phenols of sorghum. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 63, n. 1, p. 4-8, 1886.

JASMAN, A. J. M. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 6, p. 209-236, 1993.

JAYANEGARA, A.; TOGTOKHBAYAR, N.; MAKKAR, H. P. S.; 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**, Amsterdam, v. 150, p. 230-237, 2009.

JOBIM, C. C.; NÚSSIO, L. G.; REIS, R. A.; SCHIMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. Suplemento especial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 101-119, 2007.

KONDO, M.; KITA, K.; YOKOTA, H. Feeding value to goats of whole-crop oat ensiled whit green tea waste. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 113, p. 71-81, 2004.

KRISHNAMOORTHY, U.; RYMER, C.; ROBINSON, P. H. The *in vitro* gasproduction technique: limitations and opportunities. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, n. 1, p. 1-7, 2005.

LASCANO, C. E.; SCHMIDT, A.; BARAHONA, R. Forage quality and the environment. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 2001, São Pedro. **Proceeding…** Piracicaba: FEALQ, 2001. p. 351-356.

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

LIMA, G. F. C.; AGUIAR, E. M.; RÊGO, M. M. T.; MELO, A. B.; MACIEL, F. C.; LÔBO, R, N. B.; LIRA, M. A. Digestibilidade de nutrientes da silagem de sorgo com níveis crescentes de girassol. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2008, Aracajú. Anais… Aracajú: SNPA, 2008. 1 CD-ROM.

LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODDOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence of head-space and inoculum dilution on *in vitro* ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 62-65, 2006.

MACEDO, F. B. **Viabilidade da utilização de aditivos na ensilagem de capim-braquiarão (*Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich) Stapf cv. Marandu), manejado sob intensidades de pastejo**. 2006, 103 f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, Pirassununga, SP. 2006.

MAIOR JÚNIOR, S. G. S. **Efeitos de arranjos populacionais na produção de forragem de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) em região semi-árida**. 2006. 36 p. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agrosilvopatoris no Semi-Árido) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2006.

MASSAMA, E.; TOPPS, J. H.; NGONGONI, N. T.; MAASDORPI, B. V. Effects of supplementation with foliage from the tree legumes *Acacia angustissima*, *Cajanus cajan*, *Calliandra calothyrsus* and *Leucaena leucocephala* on feed intake, digestibility and nitrogen metabolism of sheep given maize stover *ad libitum*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 69, p. 233-240, 1997.

MAGALHÃES, P. C.; RODRIGUES, W. A.; DURÃES, F. O. M. **Tanino no grão de sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003. 2 p. (Comunicado Técnico, 88).

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

MAKKAR, H. P. S. Chemical protein precipitation and bioassays for tannins, effects and fate of tannins, and strategies to overcone detrimental effects of feeding tannins-rich feeds. In: SEMINAR OF THE FAO-CIHEAM SUB-NETWORK ON SHEEP AND GOAT NUTRITION, 9., 2001, Hammamet, Tunisia. Vienna: IAEA, 2001. p. 59.

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

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

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

MELLO, S. Q. S. Características agronômicas de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) sob três doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 35 (1): 45 – 53, 2005.

MCBEE, R. H. Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. **Applied Microbiology**, Washington, v. 1, n. 1, p. 106-110, 1953.

McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Mallow: Chalcombe Publications, 1991. 340 p.

McSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; BUNCH, R.; KRAUSE, D. O. Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria froms heep and goats fed tannin-cointaining shrub legume. *Calliandra calothyrsus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 3075-3083, 1999.

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

MELLO, S. Q. S. Características agronômicas de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) sob três doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. Goiânia, v. 35, n. 1, p. 45-53, 2005.

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

MIN, B. R.; BARRY, T. N.; ATTWOOD, G. T.; McNABB, W. C. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review, **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 106, p. 3-19, 2003.

MOREIRA, V. F.; PEREIRA, A. J.; GUERRA, J. G. M.; GUEDES, R. E.; COSTA, J. R. **Produção de biomassa de guandu em função de diferentes densidades e espaçamento entre sulcos de plantio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 5 p. (Comunicado Técnico, 57).

NEUMANN, M.; RESTLE, J.; FILHO, D. C. A.; BRONDANI, I. L.; PELLEGRINI, L. G.; FREITAS, A. K. Avaliação do valor nutritivo da planta e da silagem de diferentes

híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, p. 293-301, 2002. Suplemento 1.

NEUMANN, M.; JOÃO RESTLE, J.; NÖRNBERG, J. L.; ALVES FILHO, D. C.; MELLO, R. O.; SOUZA, A. M. N.; PELLEGRINI, L. G. Avaliação da qualidade e do valor nutritivo da silagem de híbridos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Revista Brasileira de milho e sorgo**, v.3, n.1, p. 120-133, 2004.

NOZELLA, E. F. Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físicos-químicos para redução do teor de taninos. Tese (doutorado em Ciências). p.99. Piracicaba-SP. 2006.

ODENYO, A.A.; BISHOP, R.; ASEFA, G.; JAMNADASS, R.; ODONGO, D.; OSUJI, P. Characterization of tannin-tolerance bacterial isolates from East African ruminants. **Anaerobe**. V.7, p.5-15. 2001.

OLIVEIRA, R. P.; FRANÇA, A. F.; FILHO, O. R.; OLIVEIRA, E. R.; ROSA, R.; SOARES, T. V.; MELLO, S. Q. S. Características agronômicas de cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) sob três doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 1, p. 45-53, 2005.

PEREIRA, J. R. A. Como produzir silagem com menor custo? **Informativo Pioneer**, Santa Cruz do Sul, n. 24, p. 8-9, 2007.

PEREIRA, J. A.; AZEVEDO, A. R.; ALVES, A. A.; PIMENTEL, J. C. M.; VELOSO JUNIOR, R. R.; CASTRO, A. B. Composição químico-bromatológica da silagem de capim-elefante com diferentes níveis de leucena. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. 1 CD-ROM.

PEREIRA, R. C.; EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G.; AMARAL, P. N. C.; SALVADOR, F. M.; MACIEL, G. A. Efeitos da inclusão de forragem de leucena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit) na qualidade da silagem de milho (*Zea mays* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 924-930, 2004.

PHATAK, S. C.; NADIMPAlLl, R. G.; TIWARI, S. C.; BHARDWAJ, H. L. *Pigeon peas*: colheita nova potencial para os Estados Unidos do Sudeste. In: JANICK, J.; SIMON, J. E. (Ed.). **Colheitas novas**. New York: Wiley, 1993. p. 597-599.

PLAYNE, M. J.; McDONALD, P. T. The buffering constituents of herbage and of silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 17, p. 264-268, 1966.

POMPEU, R. C. F. F. **Valor nutritivo e características fermentativas de silagens de grãos úmidos de sorgo**. 2003. 60 p. Monografia (Estágio Supervisionado) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

PORTAS, A. A.; SOUZA, J. A. **Guandu em recuperação de pastagens e na integração agricultura-pecuária**. Campinas: CECOR/CATI, 2006. (CATI Responde, 56).

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

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

RESTLE, J.; NEUMANN, M.; BRONDANI, I. L.; FILHO, D. C. A.; BERNARDES, R. A. C.; ARBOITTE, M. Z.; ROSA, J. R. P. Manipulação do corte do sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) para confecção de silagem, visando a produção do novilho superprecoce. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1481-1490, 2002.

ROCHA JÚNIOR, V. R.; GONÇALVES, L. C.; RODRIGUES, J. A. S.; BRITO, A. F.; RODRIGUEZ, N. M.; BORGES, I. Avaliação de sete genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) para produção de silagem: I. Características agronômicas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, p. 506-511, 2000.

RYMER, C.; HUNTINGTON, J. A.; WILLIAMS, B. A.; GIVENS, D. I. *In vitro* cumulative gas production techniques: history, methodological considerations and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, n. 1, p. 9-30, 2005.

SALAWU, M. B.; ACAMOVIC, T.; STUART, C. S.; HVELPLUND, T.; WEISBJERG, M. R. The use of tannins as silage additive: effect on silage composition and mobile bag disappearance of dry matter and protein. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 82, p. 243-259, 1999.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K.; KADAN, S. S. **Dietary tannins**: consequences and remedies. Boca de Raton: CRC Press, 1990. 310 p.

SANTOS, C. A. F.; MENEZES, E. A.; ARAÚJO, F. P. Introdução, coleta e caracterização de recursos genéticos de guandu para produção de grãos e forragem. In: QUEIRÓZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (Ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**. Versão 1.0. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. Disponível em: http://www.cpatsa.embrapa.br. Acesso em: 14/10/2009

SAS INSTITUTE. **The SAS System for Windows**. Release 8.01, Cary, 2000.

SCHMIDT, P. **Perdas fermentativas na ensilagem, parâmetros digestivos e desempenho de bovinos de corte alimentados com rações contendo silagens de cana-de-açúcar**. 2006. 227 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

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

SELINGER, L. B.; FOSBERG, C. W.; CHENG, K. J. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. **Anaerobe**, Killington, v. 2, p. 263-284, 1986.

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

SILVA, D. J.; de QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SILVEIRA, P. M.; BRAZ, A. J. B.; KLIEMANN, H. J.; ZIMMERMANN, F. J. P. Acumulação de nutrientes de guandu e estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 3, p. 133-138, 2005.

SOUZA, C. G.; MORAES, J. P. G.; COSTA, C.; GONÇALVES, H. C.; REIS, W.; BALDIN, S. R. Degradabilidade ruminal do amido do sorgo com e sem tanino em diferentes formas de conservação e processamento. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: SBZ; UFLA, 2008. 1 CD-ROM.

SOUZA, V. G.; PEREIRA, O, G.; MORAES, S. A.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S. C.; ZAGO, C. P.; FREITAS, E. V. V. Valor nutritivo de silagens de sorgo. **Revista Brasileira de Zootecnia,** v.32, n.3, p.753-759, 2003.

TANGTAWEEWIPAT, S.; ELLIOTT, R. Nutritional value of pigeon pea (*Cajanus cajan*) meal in poultry diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 123-135, 1989.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducter to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 185-197, 1994.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476 p.

VELÁSQUEZ, P. A. T. **Composição química, digestibilidade e produção de gases "*in vitro*" de três espécies forrageiras tropicais**. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2006.

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