

**Universidade de São Paulo
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

RONALDO CARLOS LUCAS

**Características nutricionais e fatores antinutricionais na
fermentação ruminal *in vitro* de espécies arbóreo-arbustivas
nativas e exóticas em área de Caatinga no Sertão de Pernambuco**

**Piracicaba
2012**

RONALDO CARLOS LUCAS

**Características nutricionais e fatores antinutricionais na
fermentação ruminal *in vitro* de espécies arbóreo-arbustivas
nativas e exóticas em área de Caatinga no Sertão de Pernambuco**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla

**Piracicaba
2012**

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

Lucas, Ronaldo Carlos

Características nutricionais e fatores antinutricionais na fermentação ruminal *in vitro* de espécies arbóreo-arbustivas nativas e exóticas em área de Caatinga no Sertão de Pernambuco / Ronaldo Carlos Lucas; orientador Adibe Luiz Abdalla. -- Piracicaba, 2012.

88 f.: il.

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. Caatinga – Pernambuco 2. Compostos fenólicos 3. Gases
4. Leguminosas forrageiras 5. Nutrição animal 6. Rúmen 7. Ruminantes
8. Sustentabilidade I. Título

CDU 591.53.063 + 633.875 (813.4)

DEDICO

"A Deus por ser a luz que me guia, protegendo e me fortalecendo, com sua paz e amor"

"A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível."

OFEREÇO

À minha família: Meus pais José Lucas Filho e Francisca Piancó; meus irmãos Maria Elsa Lucas, Maria Edesia Lucas, José Renato Lucas e Arnaldo Carlos Lucas. Pela contribuição de força, companheirismo, amizade, respeito e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adibe Luiz Abdalla, pelos conhecimentos compartilhados, amizade e o apoio incondicional ao desenvolvimento da pesquisa.

À Professora Dra Maria Eunice Vieira de Queiroz (URRPE) pelo apoio incondicional, orientação, amizade, pelas lutas constantes e persistentes para o bom desenvolvimento da região semiárida.

Aos Profs. Drs. Helder Louvandini, Sobhy M.A.Sallam, Ives Cláudio da Silva Bueno e a Profa. Dra. Dorinha M.S.S. Vitti Kennedy pelo apoio e orientação durante todos os meus estudos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pela oportunidade da realização da pesquisa.

À Coordenação do Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências por conceder-me a oportunidade da realização dos meus estudos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências, Neuda, Sônia e Fábio pela paciência, ajuda e amizade.

À CAPES e CNPq pelo fomento da pesquisa por meio da bolsa de Doutorado.

Aos técnicos do LANA Maria Regina S. R. Peçanha, Lécio Aparecido Castilho e Joaquim Everaldo M. Santos por toda atenção, ajuda nas análises e amizade.

À Profa. Dra. Jacinta Diva Ferrugem, um dos maiores privilégios que tenho na vida é ser um grande amigo dessa pessoa iluminada, sincera e verdadeira.

“Para conseguir a amizade de uma pessoa digna é preciso desenvolver em nós mesmos as qualidades que naquela admiramos”.

Aos meus amigos Nicolas Berges (ETH – Zurich), Priscila Brigide, Ricardo Moura (UFRPE), Alessandra Romero, Laí Alves Filho, Andréia Roberto (ESALQ), Marcia Mourão (UFPI), Vânia Rodrigues Vasconcelos (UFPI), Lilia Raquel Fé (UFPI), Samy Emanuelle (UFPI), Anali Linhares (ESALQ), Yosra Soltan, Hani Elzaiat, Amr Salah Morsy, Edivania Pontes (ESALQ), Erika Canova, Marcelo Lima (ESALQ), Natália Arruda (ESALQ), Andressa Natel pela amizade durante meu doutorado junto ao grupo LANA.

Aos colegas da Pós-graduação do grupo LANA: Alcester Mendes, Tanimara Soares, Lerner A. Oinedo, Patrícia Pimentel, Patrícia Godoy, Bernardo Berenchtein, Fernanda Campos, Edigar Franco Gomes, Aline Campeche, Tiago Paim, pelo profissionalismo e companheirismo.

Aos estagiários e bolsistas do LANA: Adibe Luiz Abdalla Filho (Adibinho), Ingrid Mariano, Rodolfo Pereira, Fabiana Garcia, Luiz Henrique Abdalla Paro, Vitor Guerrini, Jade Soares, Tais Carvalho, Laura Oliveira, pela ajuda oferecida sempre que necessário.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na execução desse trabalho.

Agradeço e compartilho esta conquista

“Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta de alguém que o que mais queremos é tirar esta pessoa de nossos sonhos e abraçá-la. Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer. Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz. As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos. A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas. O futuro mais brilhante é baseado num passado intensamente vivido. Você só terá sucesso na vida quando perdoar os erros e as decepções do passado. A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade. A vida não é de se brincar porque um belo dia se morre.”

Clarice Lispector

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Regiões Semiáridas	19
2.2	Espécies Nativas	20
2.2.1	Aroeira (<i>Astronion urundeuva</i>)	20
2.2.2	Catingueira (<i>Caesalpinia bracteosa</i>)	20
2.2.3	Jureminha (<i>Desmanthus virgatus</i>) (L.)	21
2.2.4	Leucena (<i>leucaena leucocephala</i>)	22
2.2.5	Capim-Buffel (<i>Cenchrus ciliaris</i> L.)	23
2.3	Taninos	25
2.4	Técnica <i>in vitro</i> de produção de gases	26
	Referências	27
3	CARACTERÍSTICAS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E O EFEITO BIOLÓGICO DE PLANTAS TANINÍFERAS COM BASE NA TÉCNICA DE PRODUÇÃO DE GÁS <i>IN VITRO</i>	34
	Resumo	35
	Abstract	34
3.1	Introdução	36
3.2	Material e Métodos	37
3.2.1	Descrição da área e coleta das plantas	37
3.2.2	Coletas das amostras	38
3.2.3	Análises químicas	39
3.2.4	Quantificações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados	39
3.2.5	Bioensaio <i>in vitro</i> de produção de gases	40
3.2.5.1	Preparo do inóculo	40
3.2.5.2	Bioensaio	41
3.2.5.3	Produção de metano	42
3.2.6	Cálculos	43
3.2.7	Delineamento e análise estatística	44
3.3	Resultados e Discussão	45
3.3.1	Análise químicas	45
3.3.2	Efeito do polietileno glicol (PEG) sobre a produção de gás <i>in vitro</i>	48
3.3.3	Degrabilidade e fator de partição	50
3.3.4	Concentração de metano (%) e parâmetros de produção de metano	51
3.3.5	Correlações (r) entre a composição química, atividade biológica dos taninos e os parâmetros de produção de metano	53
3.4	Conclusões	54
	Referências.....	55

4 EFEITOS DE DIETAS CONSTITUÍDAS DE FORRAGEIRAS NATIVAS NA SÍNTESE DE NITROGÊNIO MICROBIANO <i>IN VITRO</i> E NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO PELA TÉCNICA DE PRODUÇÃO	60
Resumo	60
Abstract	61
4.1 Introdução	63
4.2 Material e Métodos	64
4.2.1 Descrição das plantas utilizadas	64
4.2.2 Dietas experimentais	64
4.2.3 Produção de gases <i>in vitro</i>	66
4.2.3.1 Coleta e preparação do inóculo	66
4.2.3.2 Ensaio <i>in vitro</i> de produção de gases	66
4.2.4 Síntese de N microbiano	67
4.2.5 Quantificação do enriquecimento de ¹⁵ N por espectrometria de massa	68
4.2.6 Produção de metano	69
4.2.7 Quantificação de AGCC	69
4.2.8 Cálculo	70
4.2.9 Delineamento e análise estatística	71
4.3 Resultados e Discussão	71
4.3.1 Análise química	71
4.3.2 Produção de gases e de metano	76
4.3.3 Degradabilidade e fator de partição	79
4.3.4 Parâmetros de fermentação	80
4.3.5 Concentração molar dos ácidos graxos de cadeia curta	81
4.4 Conclusões	83
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS	85

RESUMO

LUCAS, R. C. **Características nutricionais e fatores antinutricionais na fermentação ruminal *in vitro* de espécies arbóreo-arbustivas nativas e exóticas em área de caatinga no sertão de Pernambuco**. 2012. 88 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A vegetação nativa do sertão nordestino é rica em espécies forrageiras nos estratos herbáceo, arbustivo e arbóreo. Estudos têm revelado que acima de 70% das espécies botânicas da caatinga participam significativamente da composição da dieta dos ruminantes domésticos. Estrategicamente, as espécies lenhosas são fundamentais no contexto de produção e disponibilidade de forragem no semiárido Nordeste. Objetivou-se com este trabalho: (1) Quantificar a composição química bromatológica e os compostos fenólicos de leguminosas nativas; (2) Avaliar as características de degradação ruminal e o efeito biológico de plantas taniníferas baseado na técnica de produção de gás *in vitro* (bioensaio); (3) Estudar os efeitos de dietas constituídas de forrageiras nativas na síntese de nitrogênio microbiano *in vitro* com marcador ^{15}N e nos parâmetros de fermentação pela técnica de produção de gases. Os resultados quanto à composição química e quantificação dos compostos fenólicos das leguminosas taniníferas catingueira (*Caesalpineia bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e do capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) são apresentados. Estas plantas também foram avaliadas por incubação *in vitro*, juntamente com feno de alfafa (*Medicago sativa*) como controle, para avaliar o incremento de gás devido à adição de polietilenoglicol (PEG). As leguminosas apresentaram na produção de gases menor atividade biológica dos taninos com adição do PEG, sendo positivos os coeficientes de correlações entre o incremento na produção de gases na presença do PEG e os parâmetros de produção de metano, demonstrando o potencial destas plantas taniníferas para reduzir a produção de metano ruminal, com destaque para leucena e aroeira, com elevado teor proteico e menores teores de fibras. No capítulo 4 são apresentados os resultados do ensaio *in vitro* para avaliar os efeitos de dietas constituídas de forrageiras nativas da região de Caatinga do NE Brasileiro na síntese de nitrogênio microbiano, utilizando o marcador ^{15}N , e os parâmetros de fermentação pela técnica *in vitro* de produção gases. As dietas foram constituídas com as espécies catingueiras (*Caesalpineia bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), oriundas de três coletas (Agosto de 2008, Março de 2009 e Agosto de 2009). Dois níveis (50% e 30%) de plantas foram usadas em cada dieta simulando sistema CBL (Caatinga, Capim-buffel + Leucena). Em geral, as dietas experimentais apresentaram em sua composição química elevado teor de proteína bruta baixa concentração de compostos fenólicos. Quando estas dietas foram avaliadas pela técnica de produção de gás *in vitro*, as dietas mostraram redução na

emissão de metano, e os parâmetros fermentativos sugeriram que houve mudanças nas rotas de fermentação das dietas. O uso de leguminosas nativas da caatinga pode ser uma alternativa na região semiárida, principalmente, oferecendo características favoráveis como: valor nutricional, potencial produtivo e rusticidade. No entanto, apesar desta viabilidade, no ponto de vista nutricional pode limitar o uso de algumas espécies, devido à alta concentração de compostos fenólicos, principalmente os taninos condensados.

Palavras-chave: Análise de taninos. Polietileno glicol. Produção de gases. Leguminosas tropicais. Sustentabilidade agropecuária.

ABSTRACT

LUCAS, R. C. **Nutritional characteristics and antinutricional factors in *in vitro* rumen fermentation assay of native and exotic arboreal species from savanna area in Pernambuco.** 2012. 88 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The native vegetation of Northeastern region of Brazil is rich in forage species in the herbaceous, shrubby and arboreal strata. Studies have revealed that over 70% of botanical species from the caatinga participate significantly in the composition of the diet of domestic ruminants. Strategically, the woody species are fundamental in the context of production and availability of forage in such semi-arid area. The objectives of this work were: (1) to quantify the chemical composition and the phenolic compounds of native legumes from the semi-arid region of Pernambuco; (2) to assess the rumen degradation characteristics and biological effect of such tanniferous plants based on *in vitro* gas production technique (bioassay); (3) to study the effects of diets consist of the native forage on microbial nitrogen synthesis *in vitro* using ^{15}N as marker and the parameters of fermentation by gas production technique. Chapter 4 presented the results of the *in vitro* test to assess the effects of diets consist of native forage of Caatinga region of Brazilian NE upon the synthesis of microbial nitrogen using the ^{15}N as tracer, and fermentation parameters. Diets were formed by the species catingueira (*Caesalpinea bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), from three collections (August 2008, March 2009-August 2009). Two levels (50 and 30%) of the plants were used in each diet simulating CBL system (Caatinga + Buffel Grass + Leucena). In general, the experimental diets presented in their chemical composition high crude protein content and low concentration of phenolic compounds. When these diets were evaluated by the *in vitro* gas production technique, diets showed reduction of methane emission, and the fermentative parameters suggested that there have been changes of fermentation routes of diets. The use of legumes native to caatinga may be an alternative in the semi-arid region, primarily by offering favorable characteristics as: nutritional value, productive potential and homeliness. However, the viability, in nutritional point of view the use of some species can be limiting, because of high concentration of phenolic compounds in particular the condensed tannins.

Keywords: Analysis of tannin. Polyethylene glycol. Gas production. Tropical legumes. Agricultural sustainability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.2.1 - Resultado de análise da composição química do solo

Tabela 3.3.1 - Composição nutricional (g/Kg MS) de espécies forrageiras do sertão de Pernambuco

Tabela 3.3.2 - Adição do polietileno glicol (PEG) em leguminosas por 24 h de incubação

Tabela 3.3.3 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca, matéria orgânica (DMS, DMO, g/Kg MS) e fator de partição (FP) em 24 h de incubação

Tabela 3.3.4 - Concentração de metano (%), produção e redução potencial de metano (MRP) e incremento de CH₄ com adição de PEG (%)

Tabela 3.3.5 - Correlação (r) entre a composição química e a atividade biológica dos taninos e os parâmetros de produção de metano

Tabela 4.2.2.1 - Dietas experimentais

Tabela 4.2.2.2 - Composição química das plantas forrageiras nativas e exótica, utilizadas para constituir as dietas experimentais (tratamentos) com base no sistema de produção CBL (Caatinga + Capim-buffel + leguminosa)

Tabela 4.3.1 - Composição química das dietas experimentais (tratamentos) com base no sistema de produção CBL (Caatinga + Buffel + Leguminosa)

Tabela 4.3.2 - Produção de gases (mL/g MS) e CH₄ (mL/g MS) na fermentação *in vitro* de dietas experimentais com base no sistema de produção CBL por 24 h de incubação

Tabela 4.3.3 - Degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS g/Kg MS), matéria orgânica (DVMO g/Kg MS) e fator de partição (mL/mg MOVD) na fermentação *in vitro* de dietas experimentais por 24 h de incubação

Tabela 4.3.4 - Nitrogênio amoniacal (N-NH₃), pH, contagem de protozoários (x10⁵/mL) e a síntese de nitrogênio microbiano (NM) na fermentação *in vitro* de dietas experimentais por 24 h de incubação

Tabela 4.3.5 - Concentração (mmol/L) de ácidos graxos voláteis (AGCC) e a relação acetato:propionato nas dietas experimentais incubada por 24 h pela técnica de produção de gases

1 INTRODUÇÃO

O nordeste brasileiro abrange uma área de 1.548.672 km², correspondente a 18,3% do território nacional. A vegetação nativa da região semiárida conhecida como caatinga, ocupa uma área de 925.000 km² composta de inúmeras famílias botânicas de ervas, arbustos, árvores e cipós sendo dominada por vegetação tipo xerófila (BRASIL, 1992). Climaticamente, o semiárido nordestino caracteriza-se por clima quente e seco, com duas estações bem definidas. A estação seca ocorre entre julho e dezembro, enquanto a úmida, entre janeiro e julho, mas o balanço hídrico é negativo na maioria dos meses.

Na região Nordeste, a pecuária é a atividade mais praticada, caracterizada pela criação extensiva de bovinos, ovinos e principalmente de caprinos que, nos últimos anos vem se tornando uma atividade promissora para região. No entanto, a produção de alimentos volumosos no período seco constitui um dos maiores desafios que enfrenta a pecuária, devido às variabilidades e incertezas climáticas tornarem a cultura das forrageiras uma operação de alto risco. Em função disso, o desempenho dos rebanhos sofre influência da disponibilidade de forragem, pois as condições adversas do meio fazem com que a oferta de forragem fique aquém das necessidades dos rebanhos, tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo (SANTOS, 2008).

Neste cenário, dentre as diversas formas de reduzir ou minimizar essa escassez de forragem, destacam-se a utilização de espécies forrageiras leguminosas arbustivo-arbóreas adaptadas às condições edafoclimáticas e com alto potencial forrageiro, que contribuam significativamente no desenvolvimento dos rebanhos e que possam ser aproveitadas num curto prazo na economia regional. Embora muitas destas espécies de leguminosas apresentem elevado valor protéico, sua digestibilidade pode ser baixa devido à presença de fatores antinutricionais, principalmente o tanino (ARAÚJO et al., 2002; ZANINE et al., 2005).

Além de sua importância biológica, a caatinga apresenta um potencial de utilização como forrageira ainda pouco explorada. Existem espécies que se apresentam como boa opção alimentar para os animais, a exemplo da catingueira, aroeira, móroro, jurema preta, faveleira, umbuzeiro, jureminha, dentre outras (KILL, 2005).

Por outro lado, poucas pesquisas têm sido realizadas para a preservação e manejo das fontes locais de alimentos para animais durante a estação de seca, mesmo tendo-se conhecimento de que os caprinos os utilizam extensivamente (árvores e arbustos) na época chuvosa. Dados de composição química e digestibilidade das espécies arbóreas e arbustivas são escassos. O desconhecimento dos reais potenciais forrageiros das diversas espécies nativas tem dificultado a realização de manejo racional dos pastos naturais, o que contribui para a erradicação de espécies desejáveis do ponto de vista forrageiro (NOZELLA, 2006). Esse déficit nos estudos sobre o assunto pode ser comprovado pelo pequeno número de espécies forrageiras nativas do semiárido disponíveis comercialmente para utilização.

A possibilidade de utilização de algumas espécies do estrato arbóreo, abundantes nas épocas chuvosas e com elevado potencial para produção de fenos, justifica a realização do presente estudo visando caracterizar nutricionalmente as leguminosas taniníferas catingueira (*Caesalpinea bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e a gramínea capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.).

Os resultados deste estudo são apresentados na forma de capítulos. Nos primeiros capítulos estão a introdução e a revisão de literatura. O terceiro capítulo refere-se à quantificação da composição química, dos compostos bioativos e os possíveis efeitos dos taninos na fermentação ruminal *in vitro* por meio da técnica do bioensaio por 24 h. O quarto capítulo apresenta os resultados da avaliação dos efeitos de dietas constituídas pelas forrageiras teste na síntese de nitrogênio microbiano *in vitro* e nos parâmetros de fermentação pela técnica de produção gases.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Regiões Semiáridas

O Nordeste do Brasil apresenta maior parte de seu território ocupado por vegetação xerófila, de fisionomia e composição florística variada, denominada “caatinga”. Fitogeograficamente, a região semiárida ocupa 18,3% do território nacional. Na cobertura vegetal, a caatinga representa cerca de 925.000 km², o que corresponde a 70% da região. A temperatura varia de 24 a 35°C e a precipitação média de 250 a 1.000 mm, com déficit hídrico elevado durante todo o ano (SOUZA et al., 2001; BRASIL, 1992).

A vegetação da caatinga caracteriza-se por apresentar árvores e arbustos de porte relativamente baixo (geralmente até 5 m de altura), sem formar um dossel contínuo, com tronco de árvores e arbustos finos, freqüentemente armados, com folhagem decídua na estação seca. Cactos e bromélias terrestres semiáridas são também elementos importantes da sua paisagem. O estrato herbáceo é efêmero e constituído principalmente por terófitas e geófitas que aparecem apenas na curta estação chuvosa (QUEIROZ, 2006).

Existem dois tipos principais de caatinga mesclada na paisagem nordestina, o arbustivo-árboreo, dominante no sertão e o arbóreo que ocorre principalmente nas encostas das serras e nos vales dos rios (ARAÚJO FILHO et al., 1998). Ainda segundo os mesmos autores, as espécies arbóreas e arbustivas de maior ocorrência na caatinga pertencem às famílias das Leguminosas e Euforbiáceas, existindo também representações de várias outras famílias com potencial forrageiro.

A vegetação lenhosa constitui a mais importante fonte de forragem para o forrageamento dos rebanhos dos sertões nordestinos, compondo em até 90% a dieta de ruminantes domésticos principalmente na época seca (PETER, 1992). A manipulação de árvores e arbustos é uma técnica necessária para melhoria da qualidade e aumento da produção de forragem e requer o conhecimento adequado das características de produção de fitomassa e o valor nutritivo das plantas.

Estes fatores se relacionam com o ciclo fenológico das plantas e servem também como base para determinação da melhor época de utilização (ARAÚJO FILHO; CARVALHO, 1997). Segundo Liberman (1982), as plantas enfrentam mudanças nas condições ambientais causadas pela estacionalidade, sendo essas flutuações determinantes para as características fenológicas.

As espécies nativas do semiárido que se destacam pela resistência à seca e que fazem parte dos sistemas pecuários, além de apresentarem em sua composição um elevado nível protéico, fornecem outros produtos como madeira, frutos e túber (ARAÚJO FILHO et al., 2002). Entre as diversas espécies, merecem destaque a catingueira (*Caesalpinia bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e o capim-buffel (*Cenchrus Ciliaris* L.).

2.2 Espécies Nativas

2.2.1 Aroeira (*Astronion urundeuva*)

Espécie pertencente à família Anacardiaceae, que apresenta larga distribuição geográfica, podendo ser encontrada no México, Argentina, Bolívia e Paraguai. No Brasil, essa espécie ocorre principalmente na Região Nordeste, podendo atingir entre 5 e 20 m de altura na Caatinga, Cerrado e em zonas de transição Cerrado-Floresta Estacional e até 35 m nas Florestas Pluviais (ALICE SOFTWARE, 2004). A madeira apresenta grande resistência mecânica e é praticamente imputrescível, sendo largamente utilizada na construção civil, como vigas, ripas, caibros e tacos para assoalho (LORENZI, 1998). Além disso, também são atribuídas atividades medicinais a essa espécie, no tratamento de hemorragias, infecções respiratórias, urinárias e distúrbios no sistema digestório (MATOS, 1999). Alguns estudos (RODRIGUES, 1999; ALBUQUERQUE et al., 2004) também têm comprovado efeitos antiinflamatórios e cicatrizantes.

2.2.2 Catingueira (*Caesalpinea bracteosa*)

Espécie de potencial forrageiro da caatinga que mais demora a entrar em dormência, mantendo-se com sua folhagem por aproximadamente oito meses após o término das chuvas, embora seu máximo valor nutritivo ocorra na fase que coincide com a maior disponibilidade de forragem da região semiárida, o que confere a essa forrageira um potencial de utilização durante grande parte do período de escassez de alimentos (ARAÚJO FILHO et al., 1998). De acordo com Maia (2004), é uma espécie de ampla dispersão no Nordeste semiárido, podendo ser encontrada em diversas associações vegetais nos Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, sendo considerada endêmica da caatinga.

Essa espécie é uma planta característica da caatinga que vegeta em lugares pedregosos (PIO CORRÊA, 1984). A madeira é recomendada para lenha, carvão e estaca. É uma das plantas sertanejas cujos gomos brotam nas primeiras manifestações de umidade, portanto é uma anunciadora do período das chuvas. As folhas fenadas constituem boa forragem, e as flores, folhas e cascas são usadas no tratamento das infecções catarrais e nas diarreias (BRAGA, 1989).

A catingueira, aliada a outros recursos naturais, apresenta-se como boa alternativa alimentar para os rebanhos desse ecossistema, pois se mantém com bom teor de proteína bruta (em torno de 14%) durante boa parte do ano, principalmente, por se tratar de uma espécie que se adapta muito bem à maioria dos solos e climas, além de ser bastante tolerante à seca (BARROS et al., 1997). No entanto, informações a respeito do valor nutritivo, dos dados de produção da catingueira e das quantidades máximas que devem ser oferecidas aos animais são praticamente inexistentes na literatura (GONZAGA NETO et al., 2004).

2.2.3 Jureminha (*Desmanthus virgatus*) (L.)

A espécie *D. virgatus* é uma planta subarborescente, perene com ampla distribuição em todo o continente americano, sendo encontrada desde o Texas até América do Sul (FORLIN et al., 2000). Possui variação desde planta ereta, nos

trópicos úmidos e arbustivos compactos, na zona semiárida, até plantas prostradas nas regiões montanhosas (BURT, 1993). Na região semiárida a sua ocorrência é em larga escala em solos arenosos e areno-argilosos. Essa cultura possui ótima produção de sementes, o que facilita a sua propagação. O seu período de floração e frutificação ocorrem nos meses de novembro, dezembro, março, junho e julho (LUCKOW, 1993). Sua rusticidade, agressividade e persistência permitem pastejo direto, podendo ser utilizada também para formação de banco de proteínas ou em consórcio com gramíneas.

Segundo Dornelas (2003), a jureminha apresenta grande potencial para arraçoamento dos ruminantes de modo a proporcionar máxima produção de massa microbiana. O feno destaca-se, quando comparado a outras forrageiras como feijão bravo (*Capparis flexouosa* L.) e maniçoba (*Manihot glaziovii* Mul.), por apresentar teores entre 20 a 30 % de proteína bruta na matéria seca. Suas características nutritivas permitem sugerir o seu uso no arraçoamento do rebanho durante o período de estiagem, de forma a garantir a manutenção dos animais (FIGUEIREDO, 1989).

O valor forrageiro da jureminha foi estudado por vários pesquisadores. Jones et al., (1998) relatam valores médios de proteína bruta (PB), matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) iguais a 16, 87, 48 e 33 % respectivamente.

2.2.4 Leucena (*Leucaena leucocephala*)

É uma leguminosa perene, de porte arbóreo ou arbustivo, da família das Leguminosae e subfamília Mimosoideae (LOPES et al., 1998). A leucena é originária da América Central, sendo sua ocorrência difundida em parte na América do Sul.

Segundo Araujo Filho et al. (2006), a leucena é umas das forrageiras mais promissoras para o semiárido, principalmente pela capacidade de rebrota mesmo durante a época seca, pela ótima adaptação às condições edafoclimáticas do nordeste e pela excelente aceitação por caprinos, ovinos e bovinos. Suas características morfofisiológicas mostram grande diversidade de uso e o seu porte

arbóreo com altura variando de 3 a 20 metros, apresenta alto teor protéico (20-35 % de proteína bruta) e raízes profundas, estas características qualificam a espécie, como uma excelente forrageira com tolerância à seca.

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

De acordo com Araújo Filho et al. (1998), o uso da leucena em banco de proteína para pastejo direto ou para produção de forrageiras verde, para o consórcio com culturas anuais e gramíneas forrageiras e para produção sementes, mostra-se uma alternativa viável para agropecuária da região.

Segundo Almeida et al. (2006), ao avaliarem a composição química (base MS) do feno de leucena em duas épocas do ano, encontraram os percentuais na base seca de 22 e 25% para a PB, 67 e 63% de FDN e 29 e 27% de FDA para os períodos seco e chuvoso, respectivamente.

Vários autores indicam a leucena como sendo uma fonte protéica de alta qualidade nutricional e excelente fonte de macro e micronutrientes. No entanto, a presença de fatores antinutricionais como a mimosina (HUGLES, 1998) e compostos fenólicos (LONGO, 2002; VITTI et al., 2005) podem comprometer a sua utilização na alimentação de ruminantes.

2.2.5 Capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.)

Algumas alternativas de gramíneas para cultivo na caatinga têm sido testadas no intuito de aumentar a produtividade e comprovar a maior resistência destas às secas. Dentre elas, o capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L) é uma gramínea exótica, originária da África, apresenta crescimento ereto, em forma cespitosa (touceira), com sistema radicular fasciculado e pivotante (pode alcançar profundidade de até quatro metros em zonas áridas e semiáridas), rápida germinação, precocidade na produção

de sementes e capacidade de entrar em dormência no período seco tornando-se uma alternativa considerável de exploração no semiárido nordestino, pois agrega ainda um bom valor nutritivo (MOREIRA et al., 2007).

De acordo com Oliveira (1981), o capim-buffel produz forragem com boa palatabilidade e digestibilidade, apresentando valor nutritivo e sendo aceito pelos animais em qualquer estágio de crescimento. Neste contexto, a sua adoção pelos pecuaristas como planta forrageira mais adaptada às condições semiáridas possibilita seu cultivo em larga escala (OLIVEIRA, 1993). Alguns cultivares têm sido usados, podendo-se destacar: Gayndah, Bioela, Americano e Molopo. Em muitas áreas o seu cultivo tem retirado a vegetação nativa, buscando aumentar a capacidade suporte das propriedades. Entretanto, a sua implantação pode também estar associada ao manejo integrado da caatinga visando aproveitar a potencialidade do capim como complemento da pastagem nativa. Dessa forma, poderá ser mantido o equilíbrio ecológico da caatinga, pois somente parte da vegetação nativa seria substituída pela pastagem cultivada (MOREIRA et al., 2007).

Segundo Camurca et al. (2002), o capim-buffel possibilita a produção de feno de boa qualidade, com teor de proteína bruta entre 6 e 10%, de acordo com a época de corte. Os mesmos autores observaram teores de proteína bruta de 10,9% aos 35 dias de rebrota, afirmando ser esta uma boa idade para o corte do capim-buffel para fenação. Com relação à digestibilidade da matéria seca, esses autores observaram que há queda acentuada nos valores à medida que avança a idade da planta. Esses autores citaram queda de 20 pontos percentuais na digestibilidade, quando se cortou a planta com 42 (67,1%) e 84 dias (47,0%).

O capim-buffel pode atingir até 7 toneladas por hectare de matéria seca com cortes entre 42 e 56 dias de idade. Entretanto, apesar do aumento substancial na produção de matéria seca neste período, ocorre sensível diminuição na relação folha-caule, o que poderia comprometer seu valor nutritivo. A sua adoção pelos pecuaristas, como planta forrageira mais adaptada às condições semiáridas do nordeste, motivou diversas avaliações cujos resultados abrangeram vários aspectos do seu cultivo, manejo e utilizações (SANTOS et al., 2005).

2.3 Taninos

Os taninos são polímeros de composto fenólico de elevado peso molecular, os quais contêm hidroxilas que formam fortes complexos com proteínas e outras moléculas e são sintetizados em certas espécies de plantas como fatores proteção herbívoras (VAN SOEST, 1994; GINER-CHAVES, 1996). A sua concentração pode variar nos tecidos vegetais, dependendo da idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou, ainda, do local de coleta (TEIXEIRA et al., 1990; SIMON et al., 1999; LARCHER, 2000).

Segundo Pizzi (1993), o termo "tanino" tem sido usado frequentemente para definir duas classes diferentes de compostos químicos de natureza fenólica, ou seja, os taninos hidrolisáveis e os taninos condensados. Para Metche (1980), os taninos hidrolisáveis podem ser considerados como poliésteres da glucose, podendo ser classificados em duas categorias, os galotaninos, que por hidrólise ácida liberam o ácido gálico e seus derivados, e os elagitaninos, que por hidrólise liberam o ácido elágico, ácido valônico, sendo o ácido elágico o mais importante.

Pizzi (1993) afirmou que os taninos condensados (TC) consistem de unidades de flavonóides com diferentes graus de condensação. De acordo com Bhat et al. (1998), os taninos condensados são mais difíceis de serem degradados do que os hidrolisáveis, podendo ser tóxicos para uma variedade de micro-organismos.

Beelen (2006) encontrou valores de 20,7%, 12,7% e 20,1% para TC na MS das folhas de jurema preta, mororó e sabiá. Este autor observou que a alta concentração de tanino condensado não só influenciou negativamente a degradação ruminal da matéria seca, proteína bruta e fibra em detergente neutro, como também diminuiu o consumo, a adesão microbiana às folhas das forrageiras e reduziu a atividade enzimática no conteúdo ruminal de caprinos.

O consumo de taninos por ruminantes pode ainda estar relacionado a efeitos positivos. Dentre os efeitos favoráveis associados às concentrações por volta de 3-4% da MS, destacam-se a proteção da proteína alimentar contra a excessiva degradação ruminal, a diminuição do desperdício de amônia, o aumento da absorção de aminoácidos provenientes da dieta no intestino delgado e a prevenção

do timpanismo. Efeitos negativos dos taninos sobre a nutrição incluem a redução do consumo e da digestibilidade, a inibição de enzimas digestíveis e perdas de proteínas endógenas (GETACHEW et al., 2000a).

A diminuição da aceitabilidade das forrageiras também pode ser provocada pelo tanino, em função de sua adstringência. A adstringência é a sensação causada pela formação de complexos entre os taninos e as glicoproteínas salivares, o que pode aumentar a salivação e diminuir a aceitabilidade do alimento (REED, 1995). Quanto menor a aceitabilidade, menor a ingestão de alimento e, por consequência, a produtividade animal.

2.4 Técnicas *in vitro* de produção de gases

Os métodos biológicos capazes de simular o processo digestivo através de micro-organismos *in vitro* (TILLEY; TERRY, 1963) ou *in situ* (ØRSKOV et al., 1980) têm sido utilizados como alternativa ao método *in vivo* para a avaliação de forrageiras. Entretanto, as desvantagens destes métodos que consistem em não descrever a cinética da digestão ou superestimar a fermentação ruminal, respectivamente, têm resultado no emprego de outras técnicas, como por exemplo, a produção de gases (MENKE et al., 1988; THEODOROU et al., 1994; BUENO et al., 2005).

As técnicas *in vitro* de produção de gases são capazes de simular o ambiente ruminal e a digestão enzimática (THEODOROU et al., 1994), além de descrever a cinética de fermentação ruminal e estimar o consumo (BLÜMMEL; ØRSKOV, 1993). Dessa forma, elas têm se tornado uma opção para os estudos de forrageiras (GETACHEW et al., 1998). As técnicas de produção de gás e de bioensaio simulam a fermentação ruminal em condições controladas e baseiam-se na estimativa do volume de gases produzidos por meio da leitura direta com seringa graduada ou mesmo por predições do volume a partir de dados de pressão (MENKE et al., 1988; THEODOROU et al., 1994; MAKKAR et al., 1995; MALAFAIA et al., 1998; CABRAL et al., 2000, BUENO et al., 2005).

Segundo Makkar et al. (1995), a técnica do bioensaio cujo princípio é a produção de gases, tem como base o uso de PEG (polietileno glicol) na determinação dos efeitos dos taninos condensados. A afinidade das moléculas de taninos pelo PEG resulta em acréscimos na produção de gases e por meio de diferença é possível avaliar a atividade biológica dos taninos presentes nos alimentos (BUENO et al., 2008). A metodologia consiste em incubar substratos taniníferos com e sem PEG em ensaio *in vitro* de produção de gases e, após 24 h, quantificar o incremento na produção do gás devido à presença do PEG.

Tiemann et al. (2008) demonstraram a utilização do PEG em ensaio de produção de gases para estimar o efeito do teor de tanino sobre a produção de metano *in vitro*. O uso do PEG como agente neutralizante do tanino para melhorar o valor nutritivo de alimentos taniníferos tem sido estudado (BEM SALEM et al., 2002; MAKKAR, 2003; BUENO et al., 2008). Embora esta técnica de incorporação de PEG seja bastante efetiva, o sucesso na sua adoção por fazendeiros depende da relação de custo-benefícios.

2.5 Objetivos

Objetivou-se com este trabalho inicialmente caracterizar nutricionalmente as leguminosas taniníferas catingueira (*Caesalpinia bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*). Posteriormente, dietas constituídas com estas forrageiras nativas da região de Caatinga do NE Brasileiro e a gramínea capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.) foram preparadas e estudadas a síntese de nitrogênio microbiano, utilizando o marcador ¹⁵N, e os parâmetros de fermentação pela técnica *in vitro* de produção gases.

Referências

ALBUQUERQUE, M. C. F.; COELHO, M. F. B.; ALBRECHT, J. M. F. Germinação de sementes de espécies medicinais do Cerrado. In: COELHO M. F. B.; COSTA JUNIOR, P.; DOMBROSKI, J. L. (Org.). **Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais**. Cuiabá: UNICEN Publicações, 2004. p. 157-181.

ALMEIDA, A. C. S.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, J. A. A.; LIRA, M. A.; GUIM, A. Avaliação bromatológica de espécies arbóreas e arbustivas de pastagens em três municípios do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2006.

ALICE SOFTWARE. **Árvores e arbustos: *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.** 2004. Disponível em: http://www.alicesoftware.com/webs/trees/aweb/td001/td_00045.htm. Acesso em: 26 set. 2007.

ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V.; MARTINS, F. R. Repartição da flora lenhosa no domínio da caatinga. In: ARAÚJO, F. S.; RODAL, M. J. N.; BARBOSA, M. R. V. (Org.). **Análise das variações da biodiversidade do bioma caatinga**: suporte a estratégias regionais de conservação. Brasília, DF: MMA, 2006. cap. 1, p. 15-33.

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

ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C.; GADELHA, J. A.; CAVALCANTE, A. C. R. Fenologia e valor nutritivo de espécies lenhosas caducifólias da caatinga. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 360-362.

ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C.; GARCIA, R.; SOUSA, R. A. Efeitos da manipulação da vegetação lenhosa sobre a produção e compartimentalização da fitomassa pastável de uma caatinga sucessional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 11-19, 2002.

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

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

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

BEN SALEM, H.; ATTI, N.; NEFZAOU, A. Polyethylene glycol in concentrate or feedblocks to deactivate condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. 1. Effects on intake, digestion and growth by Barbarine lambs. **Animal Science**, East Lothion, v. 75, p. 125-135, 2002.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente no Ceará**. 4. ed. Natal: UFRN, 1989. p. 311-312.

BRASIL. Portaria 006/92-N de 15 de janeiro de 1992. Lista oficial das espécies da flora ameaçadas de extinção. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 jan. 1992. Seção 1.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of "*in vitro*" gas production and nylon degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 109-119, 1993.

BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in gas production method. **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. 41, p. 153–170, 2008.

BURT, R. L. Desmanthes: A tropical end subtropical forage legume: Part artificial key and specie descriptions. **Herbage Abstract**, Wallingford, v. 63, p. 474-478, 1993.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; MALAFAIA, P. A. M.; LANA, R. P.; SILVA, J. F. C.; VOEORA, R. A. M.; PEREIRA, E. S. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2087-2098, 2000. Suplemento 1.

CAMURCA, D. A.; NEA, J. N. M.; PIMENTEL, J. C. M.; VASCONCELOS, V. P.; LÔBO, R. N. B. Desempenho produtivo de ovinos alimentados com dietas a base de feno de gramíneas tropicais **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 5, p. 2113-2122, 2002.

DORNELAS, C. S. M. **Cinética ruminal em caprinos de forrageiras nativas**. 2003. 63 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2003.

FIGUEIREDO, R. W. Histórico da maniçoba no Brasil: potencialidade, multiplicação e produção. In: ENCONTRO NORDESTINO DE MANIÇOBA, 1., 1989, Recife. **Anais...** Recife: SUDHEVEA; IPA, 1989. p. 29-57. (Coleção Mossoroense. Série C, 469).

FORLIN, S. M.; REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. **Cultivo de tejidos de *Desmanthus virgatus*: obtención de plantas a partir de hojas**. Argentina: IBONE; Faculdade de Ciências Agrárias, 2000. (Comunicação Científicas y Tecnológicas).

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

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

GINER-CHAVES, B. I. **Condensed tannins in tropical forages**. 1996. 196 f. Doctor (Theses - Philosophy) - Cornell University, Ithaca, 1996.

GONZAGA NETO, S.; BATISTA, A. M. V.; CARVALHO, F. R. R.; MARQUES, C. A. T.; SANTOS, G. A. R. Efeito da adição de feno de catingueira (*Caesalpinia bracteosa*) na ração sobre o balanço de energia e de nitrogênio em ovinos Morada Nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 5, p. 1325-1331, 2004.

KILL, L. H. P. **Caatinga: patrimônio brasileiro ameaçado**. São Paulo: Agroline.com.br. Disponível em <<http://www.agroline.com.br/artigo/>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

JONAS, R. M.; BRANDON, J. N. Persistence and productivity of eighth accessions of *Desmanthus virgatus* under a range of grazing pressures in subtropical Queensland. **Technical Grasslands**, Brisbane, v. 32, n. 87, p. 145-152, 1998.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531 p.

LIBERMAN, D. Seasonality and phenology in dry tropical forest in Ghana. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 70, p. 790-906, 1982.

LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E. Tropical and subtropical forage seed production: an overview. In: LOCH, D. S.; FERGUSON, J. E. (Ed.). **Forage seed production**. Wallingford: CAB International, 1999. v. 2, p. 1-40.

LONGO, C. **Avaliação do uso da Leucaena Leucocephala na dieta de ovinos da raça santa inês sobre consumo, digestibilidade e retenção de nitrogênio**. 2002. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 1, 352 p.

LUCKOW, M. *Desmanthus* (Leguminosae – Mimosoideae). **Systematic Botany Monographs**, Ann Arbor, v. 38, p. 1-166, 1993.

LOPES, W. B.; SILVA, D. S.; PIMENTE FILHO, E. C.; QUEIROZ FILHO, J. L.; SILVA, J. P.; SARMENTO, J. L. R.; SILVA, R. L. Avaliação da composição química da leucena submetida a dois espaçamentos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** São Paulo: SBZ, 1998. p. 179-181.

MAIA, G. N. Catingueira. In: MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: Leitura e Arte, 2004. p. 159-169.

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

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

MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; VIEIRA, R. A. M.; SILVA, J. F. C.; PEREIRA, J. C. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, p. 370-380, 2004.

MENKE, K. H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, Tubingen, v. 28, p. 7-12, 1988.

METCHE, M. Tannins: nature et propriétés. **Comptes Rendu du Groupe Polyphénols**, Paris, v. 10, p. 11-32, 1980.

MOREIRA, J. N.; LIPA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARAUJO, G. G. L. L. Potencial de produção de capim-buffel na época seca no semiárido Pernambucano. **Caatinga**, Móssoro, v. 20, n. 3, p. 22-29, 2007.

NOZELLA, E. F. **Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**. 2006. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

OLIVEIRA, M. C. **Capim-buffel nas regiões secas do nordeste**. Petrolina EMBRAPA, CPATSA, 1981. 19 p. (Circular Técnica, 27).

OLIVEIRA, M. C. **Capim-buffel produção e manejo nas regiões secas do nordeste**. Petrolina: Embrapa, Semi Árido, 1993. 18 p. (Circular Técnica, 27).

ØRSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. B.; MOULD, F. The use of the nylon bag technique for evaluation of feedstuffs. **Tropical Animal Production**, Santo Domingo, v. 5, p. 195-213, 1980.

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

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. v. 2, 777 p.

PIZZI, A. Tanin-based adhesives. In: PIZZI, A. (Ed.). **Wood adhesives: chemistry and technology**. New York: Marcel Dekker, 1993. p. 177-246.

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

QUEIROZ, L. P.; RAPINI, A.; GIULIETTI, A. M. (Org.). **Towards greater knowledge of the Brazilian Semi-arid biodiversity**. Brasília, DF: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2006. v. 1, 142 p.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 1516-1528, 1995.

RODRIGUES, L. V. **Análise morfológica e morfométrica da colite induzida por ácido acético, em ratos, e tratada com extratos vegetais (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.)**. 1999. 50 f. Tese (Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1999.

SANTOS, G. R. A.; BATISTA, A. M. V.; GUIM, A.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, M. J. A.; PEREIRA, V. L. A. Determinação da composição botânica da dieta de ovinos em pastejo na Caatinga. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 1876-1883, 2008.

SANTOS, G. R. A.; BATISTA, A. M. V.; GUIM, A.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, M. J. A.; PEREIRA, V. L. A. Caracterização do pasto de capim-buffel diferido e da dieta de bovinos, durante o período seco no Sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 454-463, 2005.

SIMÓN, B. F.; CADAHIA, E.; CONDE, E. Evolution of phenolic compounds of Spanish oak wood during natural seasoning. First results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 1687-1694, 1999.

SOUZA, S. S.; TOMASELLA, J.; GRACIA, M. G.; AMORIM, M. C.; MENEZES, P. C. P.; PINTO, C. A. M. Programa de Monitoramento Climático em Tempo Real na área de atuação da SUDENE – PROCLIMA. **Boletim da Sociedade Brasileira de Meteorologia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 15-24, 2001. Disponível em: <http://mtc-m15.sid.inpe.br/rep-/sid.inpe.br/iris@1915/2005/05.12.11.12>. Acesso em: 05 out. 2010.

TEIXEIRA, M. L.; SOARES, A. R.; SCOLFORO, J. R. S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. **Ciência Prática**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 229-232, 1990.

TIEMANN, T. T.; AVILA, P.; RAMÍREZ, G.; LASCANO, C. E.; KREUZER, M.; HESS, H. D. *In vitro* ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 146, p. 222-241, 2008.

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

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **Journal of British Grassland Society**, Oxford, v. 18, p. 104-111, 1963.

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

VITTI, D. M. S. S.; NOZELLA, E. F.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; SILVA FILHO, J. C.; COSTA, C.; BUENO, M. S.; LONGO, C.; VIEIRA, M. E. Q.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GODOY, P. B.; MUELLER-HARVEY, I. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 123-133, 2005.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, D. J.; ALMEIDA, J. C.; MACEDO JÚNIOR, G. L.; OLIVEIRA, J. S. Composição bromatológica de leguminosas do semiárido brasileiro. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 17, p.1-9, 2005.

3 CARACTERÍSTICAS DA DEGRADAÇÃO RUMINAL E O EFEITO BIOLÓGICO DE PLANTAS TANINÍFERAS COM BASE NA TÉCNICA *IN VITRO* DE PRODUÇÃO DE GÁS

Resumo

Este trabalho foi realizado visando caracterizar as leguminosas aroeiras (*Astronion urundeuva*), catingueira (*Caesalpineia bracteosa*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e leucena (*Leucaena leucocephala*) quanto à composição química e quantificação dos compostos fenólicos, degradabilidade e a produção de gases na presença de polietilenoglicol, bioensaio, por incubação *in vitro* tendo o feno de alfafa (*Medicago sativa*) como controle. As leguminosas foram coletadas em Agosto de 2008, Março de 2009 e Agosto de 2009, em quatro municípios no estado de Pernambuco. A análise química indicou que o conteúdo de proteína bruta (PB) variou entre as espécies, 143; 119; 169 e 212 g/Kg MS para aroeira, catingueira, jureminha e leucena respectivamente. Jureminha apresentou maiores teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) 589 e 430 g/Kg MS, respectivamente, enquanto que aroeira apresentou menores teores para FDN e FDA, 450 e 329 g/Kg MS respectivamente. Os resultados mostraram que a concentração de fenóis totais (FT), taninos totais (TT) e taninos condensados (TC) variaram significativamente ($P < 0,05$). O TC das leguminosas foi baixo (22, 25, 37 e 46 eq-g leucocianidina / Kg MS), entretanto todas as espécies apresentaram elevadas concentrações de FT e TT. A leucena e a jureminha apresentaram, com adição de PEG, baixo incremento na produção de gases (11 e 17%) respectivamente; enquanto que aroeira e catingueira apresentaram valores próximos (28 e 33% respectivamente), em relação ao controle (27%). A adição de PEG na produção de gás resultou em uma menor atividade biológica dos taninos, demonstrando que leguminosas neste estudo mostraram taninos com eficácia na fermentação ruminal *in vitro*. A degradabilidade *in vitro* da matéria seca e orgânica (DMS, DMO, g/Kg MS) e o fator de partição (FP) em 24 h de incubação não apresentaram efeitos ($P > 0,05$) entre os tratamentos e o controle (feno de alfafa). Houve efeito ($P < 0,05$) do CH_4 (%) da aroeira em relação ao controle, o aumento de CH_4 com adição de PEG apresentou variabilidade entre os tratamentos e o controle na ordem decrescente leucena > jureminha > aroeira > catingueira. Os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a composição química, atividade biológica dos taninos e os parâmetros de produção de metano, apresentaram variação entre as plantas em estudo. No entanto, as relações existentes entre os parâmetros mostraram que as relações entre os fatores foram positivas para atividade biológica dos taninos e o potencial de redução de metano (PRM) e com incremento CH_4 com a adição de PEG. As leguminosas estudadas mostraram ser promissoras para uso na alimentação dos ruminantes, demonstrando potencial para reduzir a produção de metano ruminal, com destaque para leucena e aroeira com elevados teores proteica e menores valores de fibras.

Palavras-chave: Caatinga. Forrageiras. Antinutricional. Degradabilidade. Polietileno glicol.

RUMEN DEGRADATION CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL EFFECT OF TANNINIFEROUS PLANTS BASED ON THE *IN VITRO* GAS PRODUCTION TECHNIQUE

Abstract

This work has been done to characterize the leguminous browsers aroeiras (*Astronion urundeuva*), catingueira (*Caesalpinia bracteosa*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) and leucena (*Leucaena leucocephala*) on the chemical composition and quantification of phenolic compounds, degradability and gas production in the presence of polyethylene glycol, bioassay, by incubation *in vitro* having alfalfa hay (*Medicago sativa*) as control. The plants were collected in August 2008, March 2009 and August 2009, in four municipalities in Pernambuco State. Chemical analysis indicated that the contents of crude protein (CP) varied between species, 143; 119; 169 and 212 g/Kg DM for aroeira, catingueira, jureminha and leucena respectively. Jureminha presented the highest neutral detergent fiber (NDF) contents and acid detergent fiber (ADF), 589 and 430 g/Kg, respectively, while smaller levels for NDF and ADF were presented by aroeira, 450 and 329 g/Kg MS respectively. The results showed that the concentration of total phenols (TF), total tannins (TT) and condensed tannins (CT) varied significantly ($P < 0.05$). The CT of all plants was low (22, 25, 37 and 46 eq-g leucocianidina/Kg DM), however all species showed high concentrations of TF and TT. The leucena and jureminha showed, with addition of PEG, less increment in gas production (11 and 17%) respectively; while aroeira and catingueira presented close values (28 and 33% respectively) compared to the control (27%). The addition of PEG in gas production resulted in a lower biological activity of tannins, demonstrating that legumes in this study showed effectiveness tannins in *in vitro* rumen fermentation. The *in vitro* degradability of dry and organic matter (DMD, OMD, g/Kg DM) and the partition factor (PF) in 24 h incubation, did not presented effects ($P > 0.05$) among the treatments and control (alfalfa hay). There was no effect ($P < 0.05$) for CH₄ (%) with aroeira compared to the control, the increase of CH₄ with addition of PEG presented variability between the treatments and control in descending order leucena > jureminha > aroeira > catingueira. The Pearson correlation coefficient (r) between the chemical composition, biological activity of tannins and methane production parameters, showed variation among the studied plants. However, the relationship between the parameters showed that the relations among the factors were positive for biological activity of tannins and the methane reduction potential (MRP) and increased CH₄ with the addition of PEG. The studied plants showed promising for use in ruminant feed, demonstrating potential for reducing ruminal methane production, with an emphasis for leucena and aroeira which showed high protein levels and small values of fibres.

Keywords: Caatinga. Forage. Antinutricional. Degradability. Polyethylene glycol.

3.1 Introdução

A vegetação que compõe o bioma caatinga possui uma riquíssima diversidade de espécies composta por três estratos: herbáceo, arbustivo e arbóreo. Estudos têm revelado que acima de 70% das espécies botânicas da caatinga participam significativamente da composição da dieta dos ruminantes domésticos (FERREIRA et al., 2009). No entanto, a forma de utilização destas plantas pode ser a mais diversa, devido à má distribuição das chuvas que promove a perda do valor nutritivo das pastagens naturais da região semiárida. Por outro lado, a diversidade entre as espécies devido a sua heterogeneidade pode viabilizar o seu uso em cada sítio ecológico.

Segundo Kill (2005), a caatinga além de possuir importância biológica, apresenta potencial de utilização como forrageira ainda pouco explorada como opção alimentar para os animais. Entre as espécies existentes neste bioma, podemos destacar: catingueira, aroeira, móroro, jurema preta, faveleira, umbuzeiro, jureminha, dentre outras. Embora muitas destas espécies de leguminosas apresentem elevado valor protéico, sua digestibilidade pode ser baixa devido à presença de fatores antinutricionais, principalmente o tanino (ARAÚJO et al., 2002; ZANINE et al., 2005).

A concentração de compostos fenólicos presentes nos tecidos vegetais pode variar de acordo com idade e tamanho da planta, da parte coletada, da época ou ainda, do local de coleta (TEIXEIRA et al., 1990; SIMON et al., 1999; LARCHER, 2000). O consumo de taninos por ruminantes pode estar relacionado a efeitos positivos. Dentre os efeitos favoráveis associados a concentrações por volta de 3-4% na MS, destacam-se a proteção da proteína alimentar contra a excessiva degradação ruminal, a diminuição do desperdício de amônia, o aumento da absorção de aminoácidos provenientes da dieta no intestino delgado e a prevenção do timpanismo. Efeitos negativos dos taninos sobre a nutrição incluem a redução do consumo e da digestibilidade, a inibição de enzimas digestíveis e perdas de proteínas endógenas (GETACHEW et al., 2000a).

As técnicas de produção de gás e de bioensaio simulam a fermentação ruminal em condições controladas e baseiam-se na estimativa do volume de gases

produzidos por meio da leitura direta com seringa graduada ou mesmo por predições do volume a partir de dados de pressão (MENKE et al., 1988; THEODOROU et al., 1994; MAKKAR et al., 1995a; MALAFAIA et al., 1998; CABRAL et al., 2000, BUENO et al., 2005).

Segundo Makkar et al. (1995a), a técnica do bioensaio cujo princípio é a produção de gases tem como base o uso de PEG (polietileno glicol) na determinação dos efeitos dos taninos condensados. A afinidade das moléculas de taninos pelo PEG resulta em acréscimos na produção de gases e, por meio de diferença é possível avaliar a atividade biológica dos taninos presentes nos alimentos (BUENO et al., 2008). A metodologia consiste em incubar substratos taniníferos com e sem PEG em ensaio *in vitro* de produção de gases e, após 24 h, quantificar o incremento na produção do gás devido à presença do PEG.

Os objetivos deste trabalho foram quantificar a composição química e os compostos fenólicos das espécies em estudo, avaliar as características de degradação ruminal e o efeito biológico das plantas taniníferas aroeira (*Astronion urundeuva*), catingueira (*Caesalpinea bracteosa*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e leucena (*Leucaena leucocephala*), com base na técnica *in vitro* de produção de gás (bioensaio).

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Descrição da área e coleta das plantas

As coletas das amostras foram realizadas na região semiárida (Sertão) do Estado de Pernambuco (latitude 8° 4' S e longitude 34° 53' O), nos municípios de Floresta, Serra Talhada, Itacuruba e Petrolândia. Esta região apresenta duas estações distintas, baseadas na precipitação anual: a estação de inverno (período das chuvas), com duração de 3 a 4 meses, que ocorre entre fevereiro e maio e a estação de verão (período da seca), com duração de 8 a 9 meses, porém a escassez de água pode se prolongar por 18 meses ou mais. As chuvas, quando ocorrem, são geralmente torrenciais e irregulares.

Embora o nível de precipitação em valores absolutos não seja muito baixo (300 - 600 mm/ano), as altas taxas de evaporação (2.000 mm/ano) causam balanço negativo de água. A umidade relativa do ar é, em média, de 50% e a temperatura média anual oscila entre 30 e 37° C. A vegetação predominante é a Caatinga Hipoxerófila (IPA, 1994). O solo é caracterizado como argissolos Vermelho-Amarelo, Latossolos Vermelho-Amarelo, Luvisolos Neossolos (EMBRAPA, 1999). Os resultados das características químicas do solo estão expressos na tabela 3.2.1.

Tabela 3.2.1 - Resultado de análise da composição química do solo

Municípios	pH kCl	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC
Floresta	6,4	7	34	2,7	54	37	11	93,9	105,1
Itacuruba	5,5	6	13	2,6	49	22	8	73,9	81,5
Petrolândia	5,3	7	9	2,1	45	21	9	68,6	77,3
Serra Talhada	6,4	12	682	8,2	48	19	8	75,5	83,1

Unidades: MO (g.Kg⁻¹); P (Mg Kg⁻¹); K, Ca, H+Al, e SB (Mmolc kg⁻¹) CTC %

3.2.2 Coletas das amostras

As coletas das leguminosas foram realizadas do mesmo modo nos quatro municípios distribuídas em três coletas (Agosto de 2008, Março de 2009 e Agosto de 2009). Cinco espécies com potencial forrageiro foram selecionadas: Catingueira (*Caesalpinea bracteosa*), Aroeira (*Astronion urundeuva*), Leucena (*Leucaena leucocephala*) e Jureminha (*Desmanthus virgatus*). Essas plantas foram selecionadas porque estudos anteriores mostraram que são importantes fontes alimentares para caprinos e ovinos na caatinga (ARAÚJO FILHO, 1994; BARROS et al., 1997; ARAÚJO FILHO et al., 1998).

Nas áreas de coletas foram selecionados quatro pontos diferentes e nesses locais o material foi coletado de cinco plantas de cada espécie, num total de 3 kg de matéria verde para cada planta. A amostragem foi feita simulando o pastejo dos animais, sendo coletadas as folhas e ramos com até 8 mm de espessura de espécies arbóreas e arbustivas presente nas áreas de pastagens. As árvores apresentam altura aproximada de 2 m.

As amostras foram secas à sombra e colocadas em bandejas de papelão por 96 h. Todo o processo de secagem foi realizado no próprio local de coleta, sendo que por várias vezes as plantas foram revolvidas para secagem homogênea. Depois as amostras foram colocadas em sacos de papel, identificadas e transportadas para o Laboratório de Nutrição Animal (LANA) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) campus de Piracicaba, SP, onde foram realizadas as análises e determinações.

Foi realizada a moagem das amostras em moinho Wiley, usando peneiras com perfuração de 1 mm para as análises químicas e avaliação *in vitro* e de 0,25 mm para determinação de compostos fenólicos. O material moído foi armazenado em potes plásticos e armazenados a temperatura ambiente em local arejado e escuro.

3.2.3 Análises químicas

As plantas foram caracterizadas quimicamente segundo a AOAC (1995), para quantificação dos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO) e proteína bruta (PB). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo Mertens (2002). O conteúdo de fenóis totais e taninos totais foram analisados pelo método Follin-Ciocalteu e taninos condensados (proantocianidinas) pelo método butanol-HCl (MAKKAR, 2000).

3.2.4 Quantificações de fenóis totais, taninos totais e taninos condensados.

Para a extração das frações a serem analisadas, 200 mg de amostra seca e moída (0,25mm) foram adicionadas a 10 mL de solução água:acetona (30:70, v/v) e submetidos a banho ultrassônico por 20 minutos. Os conteúdos foram centrifugados (4°C 10 min, 3000 xg) e o sobrenadante foi coletado e conservado em gelo. Fenóis totais foram quantificados com o reagente de Follin-Ciocalteu a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, a 725 nm (MAKKAR et al., 2000). Uma curva de calibração foi preparada usando ácido tânico (Merck GmbH, Darmstadt,

Alemanha). Fenóis totais foram calculados como equivalentes de ácido tânico e expresso como eq-g/k com base na matéria seca.

Para quantificação dos fenóis simples foram pesados 100 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) (SIGMA P- 6755) em tubos de ensaio e, nestes tubos, adicionados 1 mL de água destilada e 1 mL do sobrenadante resultante de extração descrita anteriormente. Os tubos foram centrifugados (4°C 10 min, 3000 xg) com o reagente de Follin-Ciocalteau, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, a 725 nm. Obteve-se assim a concentração de fenóis simples. A quantificação dos taninos totais foi calculada pela diferença entre o teor de fenóis totais e fenóis simples.

Os taninos condensados foram quantificados pelo método butano-HCl (MAKKAR et al., 2000). Uma alíquota do extrato foi adicionada de: 0,5 mL do sobrenadante, 3 mL de reagente butanol-HCl e 0,1 mL de reagente férrico, os reagentes foram aquecidos num banho maria por 60 min. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro, a 550 nm. Os valores de taninos condensados, expressos como equivalente-grama de leucocianidina kg^{-1} MS, foram calculados pela fórmula:

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

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

3.2.5.1 Preparo do inóculo

Seis Ovinos Santa Inês ($60 \pm 2,5$ kg de peso corporal) canulados no rúmen, mantidos em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbes*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*) foram utilizados como doadores de inóculo. Os ovinos tinham livre acesso à mistura mineral e à água e receberam individualmente suplementação diária de 0,7 kg/100 kg de peso vivo de concentrado com 20% proteína bruta.

Para o preparo do inóculo, as frações líquida e sólida do conteúdo ruminal foram coletadas separadamente e misturadas na proporção de 50% de material da fase sólida e 50% da fase líquida, sendo homogeneizadas em um liquidificador por 10 s. O material foi filtrado em tecido de algodão (“fralda”) e mantidas em banho maria a 39°C, com dióxido de carbono insuflado sobre o inóculo continuamente.

3.2.5.2 Bioensaio

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás com sistema semiautomático (BUENO et al., 2005) usando transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA-USP, Piracicaba/São Paulo). Foram realizadas três corridas e as medições da produção de gases acumulada para cada tratamento foram lidas manualmente com intervalos de leituras de 4, 8, 12 e 24 h de incubação. Para cada ensaio foram utilizadas as quatro plantas experimentais e uma planta controle (feno de alfafa) totalizando 12 repetições por planta com dois inóculos para cada corrida.

O bioensaio foi realizado para avaliar a atividade biológica dos taninos nas plantas utilizando-se polietileno glicol (PEG). Os substratos (0,5 g) foram adicionados em quatro garrafas de vidro com volume total de 160 mL. Previamente identificadas, duas das garrafas receberam 0,5 g de PEG (PEG MW 6000, Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Alemanha) de acordo com (MAKKAR et al., 1995a). Também foram preparadas quatro garrafas sem substrato, usadas como branco (duas com PEG e duas sem PEG).

Em cada garrafa foram adicionados 50 mL de solução nutritiva e 25 mL de inóculo, conforme Bueno et al. (2005). As garrafas foram fechadas com rolhas de borracha (Bello Glass Inc. Vineland, NJ, EUA), homogeneizadas manualmente e em seguida incubadas em estufa (Marconi MA35, Piracicaba-SP) a 39°C por 24 h. A cada leitura de pressão foi subtraído o total de gás produzido pelas garrafas sem substrato (branco), referente a cada amostra.

A quantidade de gases foi calculado de acordo com Araujo et al. (2011), por meio da fórmula:

$$V = 7.365 \times p$$

Onde: V é o volume de gases (mL) e p é a pressão medida (psi)

$$V = (n = 500; r^2 = 0.99)$$

Após a última leitura, cada garrafa foi imersa em água com gelo para paralisar a fermentação; em seguida, foram tratadas com solução de detergente neutro (FDN) para determinar a degradação verdadeira da matéria seca (DVMS). As garrafas foram incubadas em estufa a 105°C por 3 h, sendo o resíduo filtrado em cadinho, lavado com água quente/acetona e seco 105°C por 16 h. Após isso, os cadinhos foram postos em mufla a 550°C por 4 h, para determinar o valor da matéria mineral (MM) e por diferença pela matéria seca verdadeiramente degradada (DVMS) obter o valor da matéria orgânica verdadeiramente degradada (DVMO).

3.2.5.3 Produção de metano

Para análise do gás metano (CH₄), as amostras de gases foram colhidas durante o ensaio. Em cada leitura foi coletado 2,5 mL de gás armazenados em tubo de ensaio de 10 mL. Seringas de 5 mL (Beaton Dickson Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba-PR) foram utilizadas para colheita de gás. Após cada coleta, aliviou-se a pressão interna das garrafas, sendo elas agitadas e postas na estufa a cada momento de leitura. O gás metano (CH₄) foi quantificado em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC2014, Tokyo, Japan), equipado com coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (1,5875 milímetros OD, 1,0 mm ID, 1 m de comprimento; Ref 19.809; Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, injetor e detector de ionização de chama foram 60, 200 e 240°C, respectivamente. O hélio foi utilizado como gás de arraste (10 mL/min). A concentração de CH₄ foi determinada por calibração externa com curva analítica (0, 3, 6, 9 e 12%) feito com CH₄ puro (White Martins PRAXAIR Gases Industrial Inc. Osasco – SP; 99,5% pureza). O metano produzido foi calculado de acordo com (LONGO et al., 2006):

$$\text{CH}_4, \text{ mL} = (\text{gás total, mL} + \text{headspace, 85 mL}) \times \text{CH}_4 \%$$

3.2.6 Cálculos

O incremento da produção de gases devido à ação do PEG foi calculado após as 24 h de incubação de acordo com metodologia proposta por Makkar et al. (1995a) e revisada por Makkar et al. (2000).

$$\text{Inc gas (\%)} = \frac{\text{PG com PEG (mL)} - \text{PG sem PEG (mL)}}{\text{PG sem PEG (mL)}} \times 100$$

Os valores obtidos na produção de gases (PG) e metano (CH₄) foram expressos em (mL/g MS) e calculados para corrigir os valores da produção de gás total, ou seja, pela diferença do branco correspondente a cada amostra incubada obtiveram-se os resultados reais de cada amostra.

A partir destas determinações foram determinadas a concentração de metano proporcional a produção de gás, a produção de metano na presença de PEG e o potencial de redução de metano (PRM) de acordo com Jayanegara et al. (2009):

$$\text{Metano (\%)} = \frac{\text{Net produção de metano}}{\text{Net produção de gás}} \times 100$$

$$\text{CH}_4 \text{ com adição de PEG (\%)} = \frac{\text{CH}_4 \text{ com PEG (mL)} - \text{CH}_4 \text{ sem PEG (mL)}}{\text{CH}_4 \text{ sem PEG (mL)}} \times 100$$

O potencial de redução de metano (PRM) foi calculado utilizando a concentração do metano do feno de alfafa (controle) de 100%:

$$\text{PRM} = \frac{\% \text{ Net CH}_4 \text{ Controle} - \% \text{ Net CH}_4 \text{ Teste}}{\% \text{ Net CH}_4 \text{ Controle}}$$

O fator de partição (FP) foi feito de acordo com a metodologia proposta por Blummel e Lebzien (1997), considerando a relação entre a MOVD (mg) e a PG (mL).

3.2.7 Delineamento e análise estatística

O experimento foi conduzido com delineamento em bloco ao acaso, no qual foram utilizados cinco tratamentos (aroeira, catingueira, jureminha, leucena e alfafa como controle) com oito repetições (garrafas) para cada tratamento em três coletas. As fontes de variação foram controladas pela análise de variância, usando o procedimento GLM (PROC GLM) do programa computacional SAS (2009), versão 9.1.

$$\text{Modelo matemático: } Y_{ij} = \mu + T_i + b_j + e_{ijk},$$

Y_{ij} = variável dependente observada nos tratamentos e se encontra no bloco j;

μ = média geral;

T = efeito do tratamento (i_1 = aroeira; i_2 catingueira; i_3 jureminha; i_4 leucena; i_5 controle);

b_j efeito devido ao bloco (local)

e_{ij} = erro experimental aleatório associado y_i que, por hipótese, tem distribuição normal. Com média zero e variância σ^2

O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5%. Para o primeiro ensaio, no qual foram estudadas as composições químicas e compostos fenólicos das plantas, as médias corrigidas foram comparadas pelas diferenças mínimas significativas obtidas utilizando o teste de Duncan.

Para o segundo ensaio no qual foram analisadas a produção total de gás, incremento de gás devido ao PEG após 24 h e os parâmetros de fermentação, as médias ajustadas foram comparadas pelo teste t de Dunnett, sendo os tratamentos comparados individualmente ao controle.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Análises químicas

A qualidade de forragem é determinada pelo seu valor nutritivo, digestibilidade e pela quantidade de forragem que é consumida pelo animal. Pode-se assumir como valor nutritivo, a proporção de nutrientes de uma dada forragem que se torna disponível ao animal de maneira que quanto maior a sua concentração na planta, maior a resposta produtiva (SANTOS et al., 2005). No entanto, a sua concentração pode ser variável devido à diferenciação existente entre as plantas, na sua morfofisiologia. Neste contexto, os constituintes químicos desempenham uma ampla variedade de funções dos requisitos requeridos pelo animal.

Os resultados referentes à análise química e a quantificação de compostos fenólicos das plantas encontram-se na Tabela 3.3.1. Observa-se que a leucena apresentou menores ($P < 0,05$) teores de MO, FT e carboidratos totais. No entanto, a concentração de PB foi estatisticamente superior ($P < 0,05$) em relação às demais espécies. Por outro lado, verificou-se que não houve diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os valores médios de lignina, hemicelulose e taninos condensados das espécies em estudo.

A aroeira, ao contrário, apresentou os valores mais elevados ($P < 0,05$) de FT, TT e baixos teores ($P < 0,05$) de FDN, FDA e celulose. Porém, obteve uma alta concentração ($P < 0,05$) de carboidratos totais, juntamente com catingueira e a jureminha. Quanto ao teor de proteína bruta, o teor da jureminha foi superior ($P < 0,05$) ao da catingueira e aroeira.

O teor de PB encontrado neste trabalho para leucena foi superior aos observados por Vitti et al. (2005), Nozella (2006) e Godoy (2007), os quais

trabalharam com a caracterização nutricional e os compostos fenólicos de leguminosas tropicais, obtiveram os seguintes valores: 153, 197 e 192 g/Kg MS respectivamente. No entanto, foram próximos aos obtidos por Almeida et al. (2006) e por Lopes et al. (2000) que avaliaram a composição química (base MS) do feno de Leucena em duas épocas do ano; os resultados registrados foram 242 e 223 g/Kg MS, respectivamente. De acordo com esses autores, essas variações referentes aos teores de proteína bruta podem ser explicadas pelas diferenças dos estados fenológicos na coleta das amostras na época seca (fase de dormência) e na época chuvosa (início da brotação). Araujo Filho et al. (1998) ressaltam que quando a planta encontra-se na caatinga no estado lenhoso, o seu valor nutritivo pode sofrer flutuações em seu valor nutritivo ao longo do ano.

Tabela 3.3.1 - Composição nutricional (g/Kg MS) de espécies forrageiras do sertão de Pernambuco

Composição *	Leguminosas				P	EPM
	Aroeira	Catingueira	Jureminha	Leucena		
MO	943 ^a	947 ^a	947 ^a	932 ^b	***	1,9
PB	143 ^c	119 ^d	174 ^b	212 ^a	***	7,3
EE	58 ^a	56 ^a	39 ^b	58 ^a	***	13,8
FDN	450 ^b	539 ^a	589 ^a	555 ^a	***	10,9
FDA	329 ^b	396 ^a	430 ^a	390 ^a	***	2,2
LIG.	108 ^a	108 ^a	106 ^a	109 ^a	NS	4,9
Hem	120 ^a	142 ^a	159 ^a	164 ^a	NS	14,3
Cel.	270 ^c	339 ^b	391 ^a	331 ^b	***	11,9
CHO _T	742 ^{ab}	772 ^a	733 ^b	662 ^c	***	8,1
Compostos fenólicos						
FT	211,06 ^a	126,01 ^b	106,63 ^{bc}	64,94 ^c	***	12,2
TT	241,66 ^a	133,80 ^b	138,43 ^b	81,62 ^b	***	13,6
TC	22,55 ^a	25,82 ^a	37,89 ^a	46,24 ^a	NS	4,1

* MO = matéria orgânica (g/Kg MS); MM material mineral (g/Kg MS); PB= proteína bruta (g/kg MS); EE= extrato etéreo (g/kg MS); aFDNmo = fibra em detergente neutro com amilase e expressa excluindo cinza residual (g/Kg MO); FDAmo = fibra em detergente ácido (g/Kg MO); Lig. = lignina (g/Kg MS); HEMC = Hemicelulose; aFDNmo – FDAmo (g/Kg MO); CEL= celulose; FDAmo – lignina (g/Kg MS); CHO_{TT}= Carboidratos totais (1000-(MM + EE + PB) (g/kg MS); FT= fenois totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TT= taninos totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TC= taninos condensados (eq-g de leucocianidina /kg MS).

^{A,B,C,D} médias seguidas de mesma letra minúscula na linha por espécie, não diferem entre si pelos teste de Duncan (P<0,05).

*** P<0,05; NS, Não Significativo; EPM, erro padrão das médias.

Quanto à catingueira e a jureminha, apresentaram valores médios ($P > 0,05$) similares em relação à concentração de FT e taninos totais (Tabela 3.3.1). No entanto, essas similaridades tornam-se divergentes nos valores médios encontrados no FDN e FDA, onde apresentaram variações dentro de cada espécie nos valores obtidos. Porém, os teores de carboidratos totais apresentaram comportamento diretamente inverso aos teores da FDA para catingueira e jureminha.

Os teores de celulose da catingueira e jureminha diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) entre si, sendo o teor para a jureminha superior aos valores observados na leucena e aroeira. Observa-se também que existe uma similaridade de valores com o teor de celulose da catingueira. De maneira geral, os teores das fibras por espécie, foram inferiores a 70%, o que está provavelmente associado ao material coletado, formado por folha e ramos finos. De acordo com Van Soest (1994), um índice superior a 70% pode exercer influência negativa no consumo e digestibilidade da matéria seca pelos animais que a consomem.

As concentrações dos compostos fenólicos das espécies em estudo são apresentadas na Tabela 3.3.1. Observa-se que os taninos condensados apresentam valores próximos aos da literatura, indicando que as leguminosas (leucena, jureminha e aroeira) estão dentro dos níveis seguros (3 a 4%) para a nutrição de ruminantes, como recomendado por Dunca e Barry (1986). Waghom et al. (1987), Reed (1995) e Kaitho et al. (1998) relatam que essas concentrações podem apresentar algumas vantagens, como a diminuição do timpanismo, ação anti-helmíntica, diminuição da degradação da proteína no rúmen e maior retenção N.

Quanto aos teores de extratos etéreos, houve diferenças significativas entre as plantas testadas. Entretanto, as variações entre os valores foram de 58 a 39 g/Kg MS na seguinte ordem decrescente aroeira > leucena > catingueira > jureminha (Tabela 3.3.1).

3.3.2 Efeito do polietileno glicol (PEG) sobre a produção de gás *in vitro*

Segundo Makkar et al. (1995a; 2003) e Getachew et al. (2000b), ao adicionar PEG ao meio de fermentação *in vitro* na presença de plantas ou alimento, deve elevar o aumento na produção de gases. No entanto, essa adição provavelmente vai depender do nível e da natureza dos taninos (EBONG, 1995). Normalmente, o PEG possui uma alta capacidade de neutralização dos efeitos adversos dos taninos livres em relação aos taninos ligados à fibra, refletindo assim, na redução dos efeitos negativos sobre a fermentação e disponibilizando nutrientes, como proteína, aos micro-organismos (BEN SALEM et al., 2002; MAKKAR et al., 2003).

Na Tabela 3.3.2 são apresentados os valores médios da produção de gases de leguminosas com e sem adição do polietileno glicol (PEG) por 24 h de incubação. As espécies em estudo diferiram estatisticamente em relação ao controle (alfafa) no volume de gases produzidos com adição de PEG. A leucena, jureminha e aroeira apresentaram com adição de PEG volumes de 150, 149, e 146 mL g/MS respectivamente, entretanto, a catingueira, apresentou maior teor ($P < 0,05$), comparada com as demais. Sem a presença de PEG, a aroeira apresentou diferença ($P < 0,05$) comparada ao controle.

De acordo com esses resultados, este comportamento pode estar diretamente relacionado com as variações existentes, dentro de cada espécie (tratamentos), devido as suas características genótípicas em relação às concentrações dos compostos fenólicos e os teores de fibras, refletindo assim, seus efeitos sobre a produção de gases (MUETZEL et al., 2006; SALEM et al., 2006). Segundo Sallam et al. (2010), a produção de gás *in vitro* pode ser utilizada, para determinar o valor nutritivo e identificar diferenças na digestibilidade potencial e conteúdo de energia de forragens, incluindo leguminosas e gramíneas.

Tabela 3.3.2 - Adição do polietileno glicol (PEG) em leguminosas por 24 h de incubação

Leguminosa	S/PEG	C/PEG	INC	EPM
	mLg/MS		(%)	
Alfafa	124,57 ^a	130,00 ^a	5 ^a	2,1
Aroeira	109,45 ^b	146,76 ^b	36 ^b	4,4
Catingueira	146,55 ^c	174,91 ^c	33 ^c	9,8
Jureminha	132,12 ^a	149,25 ^d	11 ^a	4,4
Leucena	13612 ^a	150,55 ^e	17 ^a	3,9

* A, B, C, D, E Médias seguidas de mesma letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente da amostra controle (Alfafa) pelo teste t de Dunnett (P<0,05).

EPM erro padrão da média

Os resultados da PG obtidos com adição de PEG foram controversos em relação aos valores observados por Nozella (2006), Godoy (2007) e Sallam et al. (2010). Estes autores trabalharam com leguminosas taniníferas incubadas com e sem PEG, obtiveram valores inferiores aos obtidos no presente trabalho para aroeira, catingueira, leucena e alfafa (77,3; 72,0; 93,1 e 132,8 mLg/MS respectivamente). No entanto, as concentrações dos compostos fenólicos, observadas pelos mesmos autores apresentaram valores superiores em relação aos observados neste estudo. Estes resultados podem ser devidos aos efeitos complexos dos compostos fenólicos na PG, resultando em uma variabilidade na fermentação *in vitro*.

Na Tabela 3.3.2 os valores do incremento de PEG apresentaram diferenças (P<0,05), entre as espécies e o controle. A incorporação do PEG, entre as espécies em estudo, proporcionou uma redução de incremento na PG. Os valores obtidos para jureminha e a leucena (11 e 17 respectivamente) foram maiores em relação ao controle. Entretanto, para a aroeira e a catingueira o percentual de incremento foram superiores (P<0,05) ao controle. Estes resultados corroboram com a afirmativa de que as concentrações de taninos mesmo sendo similares nas leguminosas podem variar devido à conformação química das moléculas, resultando em diferentes atividades biológicas (VITTI et al., 2005).

Segundo a literatura, a adição de PEG durante a incubação de leguminosas taniníferas aumenta a produção de gás (GETACHEW et al., 2000b), sugerindo que os taninos liberados como resultado da degradação FDN pelos micro-organismos, são biologicamente ativos e podem ter impacto sobre a fermentação no rúmen. Os compostos fenólicos em diferentes espécies arbóreas e arbustivas com a mesma concentração produzem efeitos de diferentes magnitudes nas taxas de produção de gás e digestibilidade (MAKKAR et al., 1995a). Neste contexto, a afinidade das moléculas de taninos pelo PEG resulta em acréscimos na produção de gases e, por meio de diferença na produção de gases, é possível avaliar a atividade biológica dos taninos presentes nos alimentos (BUENO et al., 2008; MAKKAR, 2003).

3.3.3 Degradabilidade e fator de partição

Na Tabela 3.3.3 encontram-se os valores da degradabilidade *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica (DMS, DMO, g/Kg MS) e o fator de partição (FP) em 24 h de incubação. Observa-se que não houve diferença ($P>0,05$) da DMS entre o controle e as espécies em estudo. Entretanto, o valor obtido da DMO para jureminha diferiu estatisticamente em relação controle. A resposta para os valores de degradação *in vitro* da matéria seca e da matéria orgânica pode estar correlacionada com as concentrações dos compostos fenólicos e dos terores de fibras presentes nas espécies (Tabela 3.3.1).

De acordo com Batista e Mattos (2004), a redução da degradabilidade das dietas dos ruminantes em área de caatinga está relacionada à maior participação de caules e de folhas de plantas lenhosas, ricas em compostos secundários e a lignificação da FDN. Neste contexto, altas correlações negativas podem ocorrer entre fibra em detergente ácido e ligninas com digestibilidade da matéria seca e orgânica de várias gramíneas e leguminosas forrageiras (VAN SOEST, 1994; AMMAR et al., 2005). O efeito negativo do conteúdo da parede celular na PG pode ser pela redução da atividade microbiana por aumentar as condições adversas do meio com o progresso de incubação (NOZELLA, 2006).

Tabela 3.3.3 - Degradabilidade *in vitro* da matéria seca, matéria orgânica (DMS, DMO, g/Kg MS) e fator de partição (FP) em 24 h de incubação

Composição	DMS	DMO	FP
Alfafa	547 ^a	590 ^a	3,36 ^a
Aroeira	456 ^a	475 ^a	4,04 ^a
Catingueira	512 ^a	471 ^a	4,02 ^a
Jureminha	547 ^a	445 ^b	3,18 ^a
Leucena	547 ^a	488 ^a	3,29 ^a
EPM	14,2	15,4	0,2

* ^{A, B} Médias seguidas de mesma letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente da amostra controle (Alfafa) pelo teste t de Dunnett (P<0,05).

EPM erro padrão da média

As variações do FP em 24 h não foram significativas entre as espécies (tratamentos) e o controle (alfafa). Estes valores foram próximos dos encontrados por Sallam et al. (2010), alfafa 3,57 MOVD mL⁻¹ em 24 gases e a leucena 5,23 MOVD mL⁻¹ em 24 gases.

3.3.4 Concentração de metano (%), potencial redução de metano (PRM) e incremento de CH₄ com adição de PEG (%)

Na Tabela 3.3.4 são apresentadas as concentrações de metano (%), redução potencial de metano (PRM) e CH₄ com adição de PEG (%) em 24 h de incubação. Houve efeito (P<0,05) da concentração de metano (%) da aroeira em relação ao controle (alfafa). O percentual de incremento de CH₄ com adição de PEG apresentou variabilidade entre controle (alfafa) e os tratamentos (espécies), os valores variaram entre 69,9 a 48,9 % na seguinte ordem decrescente leucena > jureminha > aroeira > catingueira.

Estes resultados corroboram a afirmativa de que diferentes respostas observadas no presente experimentos possam estar relacionadas à atividade biológica dos taninos. A utilização das leguminosas taniníferas contribuiu na redução de metano com adição de PEG em relação ao controle (alfafa), embora, as concentrações dos compostos fenólicos foram relativamente altas em relação ao controle.

No entanto, o percentual de PRM não apresentou diferenças entre as plantas estudadas. Por outro lado, este parâmetro reflete o total de produção de metano potencialmente reduzindo nas plantas por taninos ou outros fatores antinutricionais, enquanto que o percentual no aumento de metano sobre a adição de PEG mostra a sua contribuição apenas para os taninos.

Tabela 3.3.4 - Concentração de metano (%), potencial de redução de metano (PRM) e aumento de CH₄ com adição de PEG (%)

Composição	Metano (%)	PRM	CH ₄ com adição PEG (%)
Alfafa	7,7 ^a	0 ^a	-21,2 ^a
Aroeira	6,1 ^b	10,0 ^a	51,3 ^b
Catingueira	7,3 ^a	6,7 ^a	48,9 ^c
Jureminha	7,8 ^a	9,7 ^a	58,9 ^d
Leucena	7,7 ^a	-2,7 ^a	69,9 ^e
EPM	12,0	4,6	0,4

* A, B, C, D, E Médias seguidas de mesmas letras iguais na coluna, não diferem estatisticamente da amostra controle (Alfafa) pelo teste t de Dunnett (P<0,05).

EPM erro padrão das médias

Segundo Jayanegara et al. (2009), trabalhando com plantas taniníferas e avaliando a atividade antimetogenética, reportaram que existem altas correlações entre a atividade dos taninos utilizados no bioensaio, PRM, aumento de metano sobre a adição de PEG, e na concentração de metano. Este embasamento está relacionado aos valores obtidos adição de PEG nos tratamentos (plantas) em relação ao controle. Contudo, esses autores sugerem que podem existir respostas variadas na concentração de metano sobre a adição de PEG, devido presença de outros compostos metabólicos secundários. Entretanto, para os mesmos autores, estrategicamente as leguminosas poderão ser utilizadas em dietas com objetivo de mitigação de metano produzido pelos ruminantes.

3.3.5 Correlações (r) entre a composição química, atividade biológica dos taninos e os parâmetros de produção de metano

Na Tabela 3.3.5 são apresentados os coeficientes de correlação de Pearson (r) entre a composição química, atividade biológica dos taninos e os parâmetros de produção de metano. Observa-se uma relação muito fraca entre a composição química, metano (%), PRM e CH₄ com adição de PEG. Porém, FDN e CHO_{TT}, apresentaram relação positiva (P<0,01) assim como, TC a HEMC (P<0,001) para metano (%) e PRM respectivamente. No entanto, PB e Inc. CH₄ com adição PEG (%) apresentaram uma relação negativa (P<0,001) para PRM. A relação da atividade biológica dos taninos com PRM e CH₄ com adição de PEG foram positivas e moderadas (P<0,001), devido à similaridades existente entre os valores de correlação das variáveis em estudo. Neste contexto, a quantidade do conteúdo da parede celular pode interferir negativamente na produção de gases, pois reduz a atividade microbiana. No entanto, os resultados encontrados para os coeficientes de correlação mostraram o inverso, através da atividade biológica dos taninos, influenciando a redução dos parâmetros de produção de metano.

Tabela 3.3.5 - Correlação (r) entre a composição química e a atividade biológica dos taninos e os parâmetros de produção de metano

Composição	Metano (%)	PRM	Inc. ch4 com adição PEG(%)
MO	0,04 ^{ns}	0,20 ^{ns}	0,05 ^{**}
PB	0,16 ^{ns}	-0,43 ^{**}	-0,03 ^{ns}
EE	0,01 ^{ns}	0,22 ^{ns}	0,19 ^{ns}
FDN	0,47 ^{**}	-0,16 ^{ns}	0,04 ^{ns}
FDA	0,26 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,12 ^{ns}
Lig.	-0,19 ^{ns}	-0,29 ^{**}	-0,14 ^{ns}
HEMC	0,25 ^{ns}	0,33 [*]	0,15 ^{ns}
CEL.	0,24 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	0,02 ^{ns}
CHO _{TT}	-0,14 ^{ns}	0,39 ^{**}	0,01 ^{ns}
FT	-0,25 ^{ns}	0,28 ^{***}	0,08 ^{ns}
TT	-0,27 ^{ns}	0,29 ^{ns}	0,06 ^{ns}
TC	0,32 [*]	-0,009 ^{ns}	0,26 ^{ns}
ABT	0,04 ^{ns}	0,65 ^{**}	0,69 ^{**}

MO = matéria orgânica (g/Kg MS); MM material mineral (g/Kg MS); PB= proteína bruta (g/kg MS); EE= extrato etéreo (g/kg MS); aFDNmo = fibra em detergente neutro com amilase e expressa excluindo cinza residual (g/Kg MO); FDAmo = fibra em detergente ácido (g/Kg MO); Lig. = lignina (g/Kg MS); HEMC = Hemicelulose: aFDNmo – FDAmo (g/Kg MO); CEL= celulose: FDAmo – lignina (g/Kg MS); CHO_{TT}= Carboidratos totais (1000-(MM + EE + PB) (g/kg MS); FT= fenois totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TT= taninos totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TC= taninos condensados (eq-g de leucocianidina /kg MS); ABT= atividade biológica dos taninos (mL/gMS)

^{ns} Não Significativo

* P<0,01, **P<0,001 e *** P<0,05

3.4 Conclusões

Em geral, as leguminosas estudadas mostraram-se promissoras para uso na alimentação dos ruminantes, demonstrando assim os seus potenciais de plantas taniníferas para reduzir a produção de metano ruminal. Essa efetividade foi confirmada através do efeito biológico de plantas taniníferas com base na técnica de produção de gás *in vitro* (bioensaio) e nos parâmetros de produção de metano, com destaque para leucena e aroeira com elevados teores proteicos e menores valores de teores de fibras.

Referências

- ALMEIDA, A. C. S.; FERREIRA, R. L. C.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, J. A. A.; LIRA, M. A.; GUIM, A. Avaliação bromatológica de espécies arbóreas e arbustivas de pastagens em três municípios do Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2006.
- AMMAR, H.; LÓPEZ, S.; GONZÁLEZ, J. S.; RANILLA, M. J. Chemical composition and *in vitro* digestibility of some Spanish browse plant species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 197–204, 2004.
- ARAÚJO FILHO, J. A.; SILVA, N. L. Alternativas para o aumento da produção de forragem na caatinga. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 5., 1994, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Nordestina de Produção Animal, 1994. p. 121-133.
- ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C.; GADELHA, J. A.; CAVALCANTE, A. C. R. Fenologia e valor nutritivo de espécies lenhosas caducifólias da caatinga. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p. 360-362.
- ARAÚJO FILHO, J. A.; CARVALHO, F. C.; GARCIA, R.; SOUSA, R. A. Efeitos da manipulação da vegetação lenhosa sobre a produção e compartimentalização da fitomassa pastável de uma caatinga sucessional. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 11-19, 2002.
- ARAUJO, R. C.; PIRES, A. V.; MOURÃO, G. B.; ABDALLA, A. L.; SALLAM, S. M. A. Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p.155-162, 2011.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC Internacional, 1995. v. 1, p. 1-30.
- BARROS, N. N.; SOUSA, F. B.; ARRUDA, F. A. V. **Utilização de forrageiras e resíduos agroindustriais por caprinos e ovinos**. Sobral: EMBRAPA, CNPC, 1997. 28 p.
- BARRY, T. N.; MANLEY, T. R.; DUNCAN, S. J. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pendunculatus* 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.
- BATISTA, A. M. V.; MATTOS, C. W. Aspectos nutricionais de pequenos ruminantes no semiárido. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS, 1., 2004, Recife. **Anais...** Recife, 2004. p. 75-82.

BEN SALEM, H.; ATTI, N.; NEFZAOU, A. Polyethylene glycol in concentrate or feedblocks to deactivate condensed tannins in *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage. 1. Effects on intake, digestion and growth by Barbarine lambs. **Animal Science**, East Lothion, v. 75, p. 125-135, 2002.

BLÜMMEL, M.; ØRSKOV, E. R. Comparison of "*in vitro*" gas production and nylon degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 40, p. 109-119, 1993.

BLÜMMEL, M.; STEINGASS, H.; BECKER, K. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 77, p. 911-921, 1997.

BUENO, I. Q. S.; FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALL, A. L. Influence of inoculum source in gas production method. **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. 41, p.153-170, 2008.

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; MALAFAIA, P. A. M.; LANA, R. P.; SILVA, J. F. C.; VOEORA, R. A. M.; PEREIRA, E. S. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 6, p. 2087-2098, 2000. Suplemento 1.

DAMASCENO, M. M. **Composição bromatológica de forragem de espécies arbóreas da caatinga paraibana em diferentes altitudes**. 2007. 61 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, João Pessoa, 2007.

EBONG, C. *Acacia nilotica*, *Acacia seyal* and *Sesbania sesban* as supplements to tef (*Eragrostis tef*) straw fed to sheep and goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 18, p. 233-238, 1995.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília, DF: Embrapa Produção de Informação, 1999.

FERREIRA, M. A.; SILVA, F. M.; BISPO, S. V.; AZEVEDO, M. Estratégias na suplementação de vacas leiteiras no semiárido do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 38, p. 322-329, 2009. Suplemento especial.

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

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

GODOY, P. B. **Aspectos nutricionais de compostos fenólicos em ovinos alimentados com leguminosas forrageiras**. 2007. 93 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

IPA - EMPRESA PERNAMBUCANA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Banco de dados agrometeorológicos**. Recife: IPA, 1994.

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.

KAITHO, R. J.; NS AHLAI, I. V.; WILLIAMS, B. A.; UMUNNA, N. N.; TAMMINGA, S.; VAN BRUCHEM, J. Relationships between, rumen degradability, gas production and chemical composition of browses. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 39, p. 129-144, 1998.

KILL, L. H. P. **Caatinga: patrimônio brasileiro ameaçado**. São Paulo: Agroline.com.br. Disponível em <<http://www.agroline.com.br/artigo/>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: RiMa, 2000. 531 p.

LONG, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODOY, 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. 1223, p. 62-65, 2006.

LOPES, W. B.; SILVA, D. S.; PIMENTA FILHO, E. C. QUEIROS FILHO, J. L.; SILVA, J. P.; SARMENTO, J. L. R.; SILVA, R. L. A. Avaliação morfofisiológica da *Leucaena leucocephala* submetida a dois espaçamentos em duas épocas. **Revista Científica de Produção Animal**, Teresina, v. 2, n. 2, p. 131-140, 2000.

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

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

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

MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; VIEIRA, R. A. M.; SILVA, J. F. C.; PEREIRA, J. C. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, p. 370-380, 2004.

MENKE, K. H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, Brisbane, v. 28, p. 7-12, 1988.

MUETZEL, S.; BECKER K. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 125, p. 139–149, 2006.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2002. 58 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

NOZELLA, E. F. **Valor nutricional de espécies arbóreo-arbustivas nativas da caatinga e utilização de tratamentos físico-químicos para redução do teor de taninos**. 2006. 100 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, p. 1516-1528, 1995.

SALEM, A. Z. M.; SALEM, M. Z. M.; EL-ADAWY, M. M.; ROBINSON, P. H. Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and *in vivo* digestibility in sheep and goats. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 127, p. 251–267, 2006.

SALLAM, S. M. A. H.; BUENO, I. C. S.; GODOY, P. B.; NOZELLA, E. F.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALLA, A. L. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, México, v. 12, p. 1-10, 2010.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Versão 9.1. Cary, NC: SAS Institute, 2009.

SANTOS, G. R. A.; BATISTA, A. M. V.; GUIM, A.; SANTOS, M. V. F.; SILVA, M. J. A.; PEREIRA, V. L. A. Caracterização do pasto de capim-buffel diferido e da dieta de bovinos, durante o período seco no Sertão de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 454-463, 2005.

SIMÓN, B. F.; CADAHIA, E.; CONDE, E. Evolution of phenolic compounds of Spanish oak wood during natural seasoning. First results. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 1687-1694, 1999.

TEIXEIRA, M. L.; SOARES, A. R.; SCOLFORO, J. R. S. Variação do teor de tanino da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em 10 locais de Minas Gerais. **Ciência Prática**, Lavras, v. 14, n. 2, p. 229-232, 1990.

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

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

VITTI, D. M. S. S.; NOZELLA, E. F.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; SILVA FILHO, J. C.; COSTA, C.; BUENO, M. S.; LONGO, C.; VIEIRA, M. E. Q.; CABRAL FILHO, S. L. S.; GODOY, P. B.; MUELLER-HARVEY, I. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 123-133, 2005.

WAGHORN, G. C.; TAVENDALE, M. H.; WOODFIELD, D. R. Methanogenesis from forages fed to sheep. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, Lincoln, v. 64, p. 167–171, 2002.

ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M.; FERREIRA, D. J.; ALMEIDA, J. C.; MACEDO JÚNIOR, G. L.; OLIVEIRA, J. S. Composição bromatológica de leguminosas do semiárido brasileiro. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 17, p.1-9, 2005.

4 EFEITOS DE DIETAS CONSTITUÍDAS DE FORRAGEIRAS NATIVAS NA SÍNTESE DE NITROGÊNIO MICROBIANO E NOS PARÂMETROS DE FERMENTAÇÃO PELA TÉCNICA *IN VITRO* DE PRODUÇÃO GASES

Resumo

Este estudo foi realizado com objetivo de avaliar os efeitos de dietas constituídas de forrageiras da região de Caatinga do NE Brasileiro na síntese de nitrogênio microbiano, utilizando o marcador ^{15}N ; e os parâmetros de fermentação pela técnica *in vitro* de produção gases. As dietas foram constituídas com as espécies: catingueira (*Caesalpineia bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.), oriundas de três coletas (Agosto de 2008, Março de 2009 e Agosto de 2009). Foram utilizados dois níveis (50 e 30%) das plantas em cada dieta simulando sistema CBL (Caatinga + Capim-buffel + Leucena). Análise química indicou que o conteúdo de proteína bruta (PB) das dietas apresentaram diferenças ($P < 0,05$) quando incorporadas ao nível de 50 e 30%. Quanto aos valores de extrato etéreo, ao nível de 50% as dietas 2 e 4, apresentaram similaridades nos valores (76 e 73 g/kgMS respectivamente). Ao nível de 30% a dieta 7 obteve menor valor entre as testadas, (39 g/kg MS). Os carboidratos totais das dietas aos níveis de 50 e 30% diferiram entre si. As concentrações dos compostos fenólicos das dietas diferiram entre si ($P < 0,05$) aos níveis de 50 e 30 %. Quanto à produção de gases acumulados observa-se que, as dietas 1 e 3 apresentaram respectivamente a maior (166 mL/g MS) e a menor (151 mL/gMS) volume ($P < 0,05$) ao nível de 50%. No entanto, as dietas constituídas ao nível de 30%, não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) e produziram em média 140 mL/g MS. A produção acumulada de CH_4 (mL/g MS), com a inclusão ao nível de 50 % apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as dietas testadas. Entretanto, quando expresso em mL $\text{CH}_4/100$ mL gás produzido, foi observado que, ao nível de 50% as dietas 2 e 3 foram maiores ($P < 0,05$), em relação à dieta 1 ($P < 0,05$). Porém, ao nível de 30 % todas as dietas não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre si. As concentrações totais de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) diferiram ao nível de 50 % de inclusão entre as dietas testadas. Quanto às proporções molares de acetato, as dietas apresentaram diferenças ($P < 0,05$) aos níveis de 50 e 30 %. Em geral, as dietas constituídas por leguminosas baseadas no sistema de produção CBL, apresentaram na sua composição química elevados teores de proteína bruta com baixa concentração de compostos fenólicos. Ao serem avaliadas pela técnica de produção de gases *in vitro*, as dietas apresentaram redução da emissão de metano, e os parâmetros fermentativos sugeriram que houve alterações das rotas de fermentação das dietas.

Palavras-chave: Caatinga. Leguminosas. Antinutricional. Ácidos graxos de cadeia curta.

EFFECTS OF DIETS CONSISTING OF NATIVE FORAGE ON MICROBIAL NITROGEN SYNTHESIS AND FERMENTATION PARAMETERS BY IN VITRO GAS PRODUCTION TECHNIQUE

Abstract

This study was carried out with the objective of evaluating the effects of diets consisting of forage from Caatinga region in the Brazilian northeast upon the microbial synthesis, using the nitrogen isotope ^{15}N as tracer; and fermentation parameters by in vitro gas production technique. Diets were formed by the species catingueira (*Caesalpinia bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) and Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.), from three collections (August 2008, March 2009 and August 2009). Two levels (50 and 30%) of the plants were used in each diet simulating the CBL system (Caatinga+ Buffel Grass + Leucena). Chemical analysis indicated that the contents of crude protein (CP) of diets showed differences ($P < 0.05$) when incorporated into the 50 and 30% level. As for ether extract values at the level of 50% diets 2 and 4 exhibited similar values (76 and 73 g/kg DM respectively); and at the 30% level, diet 7 got the smallest value among all tested diets (39 g/kgMS). The total carbohydrate in diets at 50 and 30% levels differed among themselves. The concentrations of phenolic compounds of diets differed among themselves ($P < 0.05$) at levels of 50 and 30% inclusion. Regarding the accumulated gas production it was observed that, diets 1 and 3 have respectively the greatest (166 mL/gMS) and the smallest (151 mL/g DM) volume ($P < 0.05$) at the level of 50%. However, diets prepared at the level of 30%, did not show differences ($P > 0.05$) among them and produced on average 140 mL/g DM. The accumulated production of CH_4 (mL/g DM), at the 50% level of inclusion, presented significant difference ($P < 0.05$) among the tested diets. However, when expressed in mL CH_4 / 100 mL gas produced, it was noted that at 50% level of inclusion, diets 2 and 3 were higher ($P < 0.05$) when compared to diet 1; but at the 30% level of inclusion, all diets did not show differences ($P > 0.05$) among them. The total concentrations of short-chain fatty acids (SCFA) differed at the level of 50% of inclusion among the tested diets. As regard the molar proportions, diets showed differences for acetate ($P < 0.05$) at levels of 30 and 50% inclusion. In general, diets consisting with the inclusion of the studied browses in the production system-based CBL presented in their chemical composition high crude protein content and low concentration of phenolic compounds. When these diets were evaluated by the *in vitro* gas production technique, diets showed reduction of methane emission, and the fermentative parameters suggested that there have been changes of fermentation routes of diets.

Keywords: Caatinga. Legumes, Antinutritional. Gas production. Short chain fatty acids.

4.1 Introdução

O valor nutricional da forragem tem reflexos diretos sobre a produtividade animal. A eficiência de utilização das plantas forrageiras pelos animais está na dependência de vários fatores, entre os quais se pode citar como mais significativa a qualidade e a quantidade de forragens disponível na pastagem e o potencial do animal. Na região semiárida, as leguminosas nativas constituem importantes fontes de nitrogênio para o rebanho da região, especialmente no período seco. Porém, a utilização de N está diretamente relacionada com os níveis de compostos secundários presentes nas leguminosas.

De acordo Pereira et al. (2005) as leguminosas contribuem com maior aporte de nutriente na dieta e incremento no ganho de peso dos animais, além de proporcionar, nos parâmetros ruminais, melhorias na redução das bactérias metanogênicas devido a presença de compostos fenólicos, como os taninos.

A presença dos taninos também contribui para proteção da proteína contra a degradação ruminal, com ação na diminuição do desperdício de amônia e o aumento da degradação da proteína no trato gastrintestinal com maior disponibilidade de aminoácidos para a eficiência animal. Os efeitos benéficos da eficiência de síntese de proteína microbiana causam um maior sincronismo na liberação de nutrientes no rúmen (fonte de energia e nitrogênio), maximizando a produção de proteína pelos micro-organismos (MAKKAR, 2003).

Na literatura são abordadas as formas e a viabilidade de utilização da proteína microbiana na nutrição de ruminantes, por estar relacionada ao fato desta ser uma fonte de alta qualidade de aminoácidos disponíveis para absorção. Além disso, a sua quantificação é importante e de interesse para a nutrição de ruminantes já que pode influenciadar na qualidade da dieta (SERRANO; SIERRA, 2010).

Para a estimativa da eficiência de síntese de compostos nitrogenados microbianos pode-se utilizar marcadores microbianos com objetivo em estimar a síntese microbiana, quantificando a sua forma, quanto a sua utilização na atividade biológica. Os marcadores podem ser classificados em dois grandes grupos:

marcadores internos, como ácidos nucleicos (DNA e RNA) e ATP, e externos, como os isotópos estáveis (^{15}N) e radioativos (^{32}P).

Objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de dietas constituídas de forrageiras nativas da região de Caatinga do NE Brasileiro na síntese de nitrogênio microbiano *in vitro*, utilizando o marcador ^{15}N e os parâmetros de fermentação pela técnica *in vitro* de produção gases.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Descrição das plantas utilizadas

Cinco espécies com potencial forrageiro foram selecionadas: catingueira (*Caesalpinea bracteosa*), aroeira (*Astronion urundeuva*), leucena (*Leucaena leucocephala*), jureminha (*Desmanthus virgatus*) e capim-buffel (*Cenchrus ciliaris* L.). Foram coletas em (Agosto de 2008, Março de 2009 e Agosto de 2009), em quatro municípios na região semiárida (Sertão) do Estado de Pernambuco. As plantas foram caracterizadas quimicamente segundo a A.O.A.C. (1995) e Mentens (2002). E a quantidade de compostos fenólicos determinada em extratos obtidos a partir de tratamento com solução aquosa de acetona (MAKKAR, 2000), conforme descrito no capítulo 3, itens 3.2.2 a 3.2.3.1 respectivamente. A origem e os procedimentos de coleta e preparação das plantas estão descritos no capítulo 3, item 3.2.1.

4.2.2 Dietas experimentais (tratamentos)

A partir dos resultados obtidos na composição química das plantas forrageiras, foram preparadas dietas experimentais (tratamentos) utilizando como base o sistema de produção CBL (Caatinga + Capim-buffel + leguminosa) para serem testadas *in vitro* pela técnica de produção de gases, quantificando os parâmetros de fermentação ruminal e a síntese de nitrogênio microbiano.

As dietas (tratamentos) foram constituídas com um “pool” de cada planta oriundas das três coletas (agosto de 2008, março de 2009 e agosto de 2009). Foram utilizados dois níveis (50 e 30%) das referidas plantas em cada dieta simulando

sistema CBL (Caatinga + Capim-buffel + Leucena) conforme descrito na Tabela 4.2.2.1.

Tabela 4.2.2.1 - Composição das dietas experimentais simulando sistema CBL

Forragem	Tratamentos (Kg)							
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8
Aroeira	0,250	-	-	0,083	0,150	-	-	0,050
Catingueira	-	0,250	-	0,083	-	0,150	-	0,050
Jureminha	-	-	0,250	0,083	-	-	0,150	0,050
Leucena	0,125	0,125	0,125	0,125	0,100	0,100	0,100	0,100
Capim-buffel	0,125	0,125	0,125	0,125	0,250	0,250	0,250	0,250
Total substrato	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500	0,500

Tabela 4.2.2.2 - Composição química das plantas forrageiras nativas e exótica, utilizadas para constituir as dietas experimentais (tratamentos) com base no sistema de produção CBL (Caatinga + Capim-buffel + leguminosa)

Composição *	Leguminosas				
	Aroeira	Catingueira	Jureminha	Leucena	C. Buffel
MO	938	945	938	930	909
PB	142	128	147	222	133
EE	53	69	32	59	26
FDN	429	602	506	528	649
FDA	307	424	402	346	463
Lig.	190	287	77	145	162
HEMC	122	177	103	181	186
CEL.	117	137	324	201	300
CHO _{TT}	742	746	759	648	750
Compostos fenólicos					
FT	250,59	155,13	90,21	71,98	30,92
TT	203,96	146,45	65,50	55,12	23,68
TC	30,40	26,43	43,23	31,16	5,17

* MO = matéria orgânica (g/Kg MS); PB= proteína bruta (g/kg MS); EE= extrato etéreo (g/kg MS); aFDN_{mo} = fibra em detergente neutro com amilase e expressa excluindo cinza residual (g/Kg MO); FDA_{mo} = fibra em detergente ácido (g/Kg MO); Lig. = lignina (g/Kg MS); HEMC = Hemicelulose: aFDN_{mo} - FDA_{mo} (g/Kg MO); CEL= celulose: FDA_{mo} - lignina (g/Kg MS); CHO_{TT}= Carboidratos totais (1000 - (MM + EE + PB) (g/kg MS); FT= fenois totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TT= taninos totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TC= taninos condensados (eq-g de leucocianidina /kg MS).

4.2.3 Produção de gases *in vitro*

4.2.3.1 Coleta e preparação do inóculo

Os doadores de inoculos foram seis Ovinos Santa Inês (60 +- 2,5 kg de peso corporal), canulados no rúmen, mantidos em pastagem de braquiária (*Brachiaria decumbes*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*). Os ovinos tinham livre acesso à mistura mineral/água e receberam individualmente suplementação diária de (0,7 kg/100 kg de peso vivo, com 20% proteína bruta).

Para o preparo do inóculo, a fração líquida e sólida do conteúdo ruminal foram coletadas separadamente e misturadas na proporção de 50% de material da fase sólida e 50% da fase líquida, sendo homogeneizadas em um liquidificador por 10 s. Isto foi feito para a recuperação dos micro-organismos celulolíticos que se aderem fortemente à fração sólida. O material resultante foi filtrado em três camadas de tecido de algodão ("fralda"). As frações filtradas foram misturadas e mantidas em banho-maria a 39°C, com dióxido de carbono insuflado sobre o inóculo continuamente.

4.2.3.2 Ensaio *in vitro* de produção de gases

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) adaptada sistema semi-automático (BUENO et al., 2005). Usando um transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA-USP, Piracicaba/São Paulo). Foram realizadas três corridas e as medições de produções de gases acumulada para todas as dietas foram lidas manualmente com intervalos de leituras de (4, 8, 12 e 24 h) de incubação. Para cada ensaio foram utilizadas oito dietas experimentais (tratamentos) totalizando seis repetições por dietas com dois níveis.

4.2.4 Síntese de N microbiano

A quantificação da síntese de nitrogênio de origem microbiana foi a através da técnica *in vitro* de produção de gases, foi utilizado o isótopo estável ^{15}N como traçador, o qual foi preparado a partir de solução de sulfato de amônio enriquecido com 0,0133g de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e enriquecimento isotópico de 25% (5,30% de ^{15}N).

Em cada garrafa de vidro com volume total de 160 mL, foram adicionadas 500 mg de cada dieta (tratamentos) juntamente com 50 mL de solução nutritiva, 25 mL de inóculo (BUENO et al., 2005) e 1 mL de solução de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido (YANG et al., 2000). As garrafas foram fechadas com rolhas de borracha (Bello Glass Inc. Vineland, NJ, EUA), homogeneizadas manualmente e em seguida incubadas em estufa (Marconi MA35, Piracicaba-SP a 39°C). O período de incubação foi de 24 h. De cada leitura de pressão foi subtraído o total produzido pelas garrafas sem substrato (branco), referente a cada amostra.

De cada leitura de pressão, foi subtraído o total produzido pelas garrafas sem substrato (branco), referente a cada amostra. A quantidade de gases foi calculado de acordo com Araujo et al. (2011).

Após a última leitura, cada garrafa foi imersa na água com gelo para paralisar a fermentação. Foram retiradas alíquotas da solução de cada garrafa para determinação de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) o qual foi analisado pelo método micro-Kjeldahlj (AOAC, 1995) e AGCC realizada em cromatográfico gasoso (CG HP 7890^a; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA).

Em seguida os tratamentos (dietas) foram separados e o conteúdo de cada garrafa foi centrifugado (1000 x g, 10 minutos), tendo como objetivo a separação dos micro-organismos ligados à fração sólida. A partir desta centrifugação retirou-se duas alíquotas do sobrenadante referente às duas garrafas por tratamento, e foram realizadas três lavagens com solução salina NaCl intercaladas com centrifugações (20000 x g, 30 min), descartando sempre o sobrenadante. O precipitado foi liofilizado e levado para quantificação do enriquecimento de ^{15}N (at%) na massa microbiana ($^{15}\text{N} - \text{NM}$) por espectrometria de massa.

A segunda alíquota referente às duas garrafas foi centrifugada (2000 x g, 30 min.), sendo descartado o sobrenadante. O precipitado foi liofilizado e levado para quantificação do enriquecimento de ^{15}N (at%) no resíduo (^{15}N – NM) por espectrometria de massa. O nitrogênio total neste resíduo foi determinado pelo micro-Kjeldahlj (AOAC, 1995).

O conteúdo das garrafas remanescentes (duas) de cada tratamento foi tratado com solução de detergente neutro (FDN), para determinar a degradação verdadeira da matéria seca (DVMS). As garrafas foram incubadas em estufa a 105°C por 3 h, sendo o resíduo filtrado em cadinho, lavado com água quente/acetona e seco a 105°C por 16 h. Por fim, os cadinhos foram postos em mufla a 550°C por 4 h, para determinar o valor da matéria mineral (MM) e, por diferença pela matéria seca verdadeiramente degradada (DVMS), obter o valor da matéria orgânica verdadeiramente degradada (DVMO).

4.2.5 Quantificação do enriquecimento de ^{15}N por espectrometria de massa

Para análise do enriquecimento isotópico, as amostras foram quantificadas por espectrometria de massa no Laboratório de Isótopos Estáveis/CENA/USP. Foi utilizado 20-200 μg em cada amostra, as quais foram seladas em cápsulas miniaturas de estanho (Sn), sendo admitidas no auto-amostrador de um ANCA com lugar para 66 amostras. As amostras foram purgadas do ar com um fluxo de He ultrapuro no auto-amostrador. Em seqüência, as amostras foram levadas para o interior de tubo de combustão vertical quando um pulso de O_2 ultra puro substitui temporariamente o fluxo de He. Por último uma coluna cromatográfica separa o N_2 de impurezas.

Uma pequena fração do efluente (0,1%) do sistema de preparação de amostra entra no IRMS através de um longo tubo capilar com um constritor para ajuste do fluxo de gás na entrada do IRMS. O gás entrando na fonte é analisado para N-total e razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, por meio das intensidades das massas 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), 29($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) e 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$) (BARRIE; PROSSER, 1996).

4.2.6 Produção de metano

Para análise do gás metano (CH₄), amostras de gases foram colhidas durante o ensaio. Em cada leitura foi coletado 2,5 mL de gás armazenado em tubo de ensaio de 10 mL. Seringas de 5 mL (Beaton Dickson Ind. Cirúrgica LTDA, Curitiba-PR) foram utilizadas para colheita de gás. Após cada coleta aliviou-se a pressão interna das garrafas, sendo elas agitadas e postas na estufa a cada momento de leitura. O gás metano (CH₄) foi quantificado em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC2014, Tokyo, Japan), equipado com uma coluna microempacotada Shincarbon ST 100/120 (1,5875 milímetro OD, 1,0 mm ID, 1 m de comprimento; Ref 19.809;. Restek, Bellefonte, PA, EUA). As temperaturas da coluna, injetor e detector de ionização de chama foram 60, 200 e 240 °C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio (10 mL/min). A concentração de CH₄ foi determinada por calibração externa com curva analítica (0, 3, 6, 9 e 12%) feito com CH₄ puro (White Martins PRAXAIR Gases Industrial Inc. Osasco – SP; 99,5% pureza). O metano produzido foi calculado de acordo com (LONGO et al., 2006).

$$\text{CH}_4, \text{ mL} = (\text{gás total, mL} + \text{headspace, 85 mL}) \times \text{CH}_4 \%$$

4.2.7 Quantificação de AGCC

A análise dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foi realizada em cromatográfico gasoso (CG HP 7890A; Injetor HP 7683B, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA) equipado com coluna capilar HP-FFAP (19091F-112; 25 0,320 mm, 0,50 mm, J&W Agilent technologies Inc., Palo Alto, CA, EUA). Com o hidrogênio (1,35 mL/min.) como gás de arraste. A curva de calibração foi estabelecida com seis padrões com concentrações crescentes. Uma alíquota de 1,6 mL de fluido ruminal tamponado foi centrifugado com 0,4mL de solução 3:1 de ácido metafosfórico 25% (Vetce química Fina Ltda., Rio de Janeiro-RJ) com ácido fórmico 98-100% (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha; COTTYN; BOUCQWE, 1968; FILÍPEK; DVORAK, 2009) + 0,2 mL de solução de ácido 2-etil-bufírico 100 mM (Padrão interno; PM= 116,16. CAS 88-09-5; Sigma Cherie GmbH, Steinheim, Alemanha). Foram centrifugados a 30 min por 15000 x g em 4 °C (Sorvall superspeed RC2-B, Newton;

CT, EUA). Após a centrifugação, aproximadamente 1,2 mL da alíquota foi transferida para tubo de vidro apropriado, os quais foram assentados em carrossel de leitura do CG.

4.2.8 Cálculo

A síntese do nitrogênio de origem microbiana (NM) utilizando o traçador isotópico, foi estimada usando a equação proposta por Wang et al. (2000):

$$NM = \frac{APE_{inNR}}{APE_{inNM}} \times NR$$

Onde: APE é a % de átomos em excesso (enriquecimento) de ^{15}N no NR (resíduo) e na NM (massa microbiana); NR é o nitrogênio total no resíduo (mg).

O fator de partição foi calculado após 24 h de incubação, de acordo com metodologia proposta por Blummel; Lebzien (1997).

4.2.9 Delineamento e análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente aleatorizado com quatro dietas (tratamentos) em dois níveis (50 e 30%) com seis repetições. As fontes de variação foram controladas pela análise de variância, usando o procedimento glm (PROC GLM) do programa computacional SAS (2009), versão 9.1. O nível de probabilidade para aceitação ou rejeição no teste de hipótese foi de 5%. Os dados foram submetidos à análise de variância de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

onde: Y_i = Variável dependente observada nas dietas (tratamentos);

μ = média observada em Y_i ;

T_i = Efeito do tratamento (dietas: d1; d2; d3; d4; d5; d6; d7 e d8);

e_i = Erro experimental aleatório associado à Y_i , que por hipótese tem distribuição normal, com média zero e variância σ^2

As variáveis dependentes foram: composição química, compostos fenólicos, produção total de gás, CH_4 , síntese de nitrogênio de origem microbiana (NM) e os parâmetros de fermentação. As médias corrigidas foram comparadas pelas diferenças mínimas significativas obtidas utilizando o teste Tukey.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Análise química

As leguminosas (arbóreas - arbustivas) utilizadas na forma de consórcio com gramíneas ou como banco de proteína representam fontes de alimentos interessantes do ponto de vista nutricional, pois possuem alto teor de proteína e digestibilidade. Essas fontes são baseadas no desempenho e nas características produtivas das plantas, utilizadas como alimentos pelos ruminantes, os quais suprem as suas necessidades quanto à efetividade em nutrientes, propiciando a eficácia dos mesmos, onde serão transformados em produtividade.

Os resultados da análise bromatológica das dietas experimentais (tratamentos) com base no sistema de produção CBL (Caatinga + Buffel + Leucena) em dois níveis podem ser observadas na (Tabela 4.3.1). Os níveis crescentes das referidas plantas substituindo a fração 50 e 30% em cada dieta apresentaram variações ($P < 0,05$) entre si, em relação aos teores de proteína bruta, estrato etéreo, carboidratos totais e compostos fenólicos.

Observa-se que os conteúdos em PB foram elevados (maiores que 100 g/kg MS) para todas as dietas. Contudo, ao nível de substituição de 50% de caatinga, o teor de proteína bruta da dieta D3 foi a que obteve maior teor ($P < 0,05$) entre as dietas testadas (196 g/kg MS), seguida pela dieta D1 (152 g/kg MS). Entretanto, ao nível 30% a dieta 5 apresentou menor ($P < 0,05$) teor (146 g/kg MS) entre as demais. Por outro lado, observa-se que as concentrações de PB das dietas D1 e D5 ao nível de 50 e 30 % respectivamente, foram compostas pela mesma leguminosa (aroeira), deferindo apenas no seu nível em percentual. A dieta D3 era composta por jureminha na proporção de 50%. Contudo, vale destacar que, a composição química de cada leguminosa (Tabela 4.2.2.2), apresentou em suas constituições, valores próximos de PB aos das dietas (tratamentos). Neste sentido, as dietas do presente experimento tiveram teores de proteína superiores ao mínimo requerido de 12 %, sendo consideradas satisfatórias (ARAÚJO et al., 2004). Por outro lado, essa afirmativa em relação ao conteúdo de proteína bruta diverge em relação aos valores obtidos na literatura. Alguns autores, trabalhando quanto a forma de fornecimento, exclusiva ou associada com gramínea com níveis crescente de leguminosa, observaram que devido a variação existente entre as espécies e dentro da própria espécie, pode ocorrer alterações na sua constituição, influenciando a sua contribuição nutricional (VITTI et al., 2005).

Tabela 4.3.1 - Composição química das dietas experimentais (tratamentos) com base no sistema de produção CBL (Caatinga + Buffel + Leguminosa)

Composição *	Tratamentos								EPM
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
MO	928 ^a	929 ^a	920 ^a	929 ^a	922 ^a	922 ^a	924 ^a	918 ^a	0,84
PB	152 ^{bc}	149 ^{bc}	196 ^a	184 ^b	146 ^c	158 ^{bc}	172 ^{abc}	178 ^{abc}	0,84
EE	47 ^{cd}	75 ^a	65 ^{ab}	72 ^a	56 ^{bc}	58 ^b	39 ^d	58 ^b	24,67
FDN	705 ^a	684 ^a	733 ^a	609 ^a	687 ^a	751 ^a	726 ^a	699 ^a	8,37
FDA	385 ^a	381 ^a	394 ^a	384 ^a	370 ^a	404 ^a	414 ^a	412 ^a	0,08
LIG.	175 ^a	98 ^a	164 ^a	156 ^a	128 ^a	125 ^a	133 ^a	126 ^a	3,44
HEMC	320 ^a	302 ^a	339 ^a	244 ^a	316 ^a	326 ^a	312 ^a	286 ^a	16,30
CEL.	210 ^a	282 ^{ab}	229 ^{ab}	228 ^{ab}	242 ^{ab}	278 ^{ab}	281 ^{ab}	286 ^b	8,45
CHO _{TT}	728 ^a	704 ^{abc}	658 ^d	672 ^{dc}	719 ^a	705 ^{abc}	712 ^{ab}	681 ^{bcd}	3,47
Compostos fenólicos									
FT	11,43 ^a	7,38 ^c	6,39 ^{de}	7,53 ^c	9,18 ^b	7,32 ^{cd}	5,57 ^e	9,56 ^b	0,35
TT	9,87 ^a	6,61 ^c	4,96 ^d	6,32 ^c	7,75 ^b	6,23 ^c	4,24 ^d	8,19 ^b	0,32
TC	31,9 ^c	25,86 ^d	37,94 ^{ab}	37,94 ^{ab}	25,05 ^d	37,50 ^{abc}	41,24 ^a	35,25 ^{bc}	1,93

* MO = matéria orgânica (g/Kg MS); MM material mineral (g/Kg MS); PB= proteína bruta (g/kg MS); EE= extrato etéreo (g/kg MS); aFDNmo = fibra em detergente neutro com amilase e expressa excluindo cinza residual (g/Kg MO); FDAmo = fibra em detergente ácido (g/Kg MO); Lig. = lignina (g/Kg MS); HEMC = Hemicelulose: aFDNmo – FDAmo (g/Kg MO); CEL= celulose: FDAmo – lignina (g/Kg MS); CHO_{TT}= Carboidratos totais (1000-(MM + EE + PB) (g/kg MS); FT= fenois totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TT= taninos totais (eq-g de ácido de tânico/kg MS); TC= taninos condensados (eq-g de leucocianidina /kg MS).

Dieta1 (50% aroeira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 2 (50% catingueira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 3 (50% jureminha + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 4 (50% aroeira, cating, jurem. + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta5 (30% aroeira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 6 (30% catingueira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 7 (30% jureminha + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 8 (30% aroeira, cating., jurem. + 50% capim-buffel + 20% leucena).

A,B,C,D,E medias seguida de mesma letra minúscula na linha por tratamanto (dieta), não diferem entre si pelos teste de Tukey (P>0,05)

NS Não Significativo

EPM erro padrão das médias

Quanto aos valores de extrato etéreo, ao nível de 50% as dietas 2 e 4, apresentaram similaridades nos valores (75 e 72 g/kg MS respectivamente). No entanto, a dieta D1 foi que apresentou menor (P<0,05) valor. Ao nível de 30% a dieta D7 obteve menor valor entre as testadas, (39 g/kg MS). De maneira geral, essas dietas foram constituídas por diferentes leguminosas, onde os seus valores estão dentro da faixa recomenda no mínimo de 2 a 3% na dieta, atendendo as necessidades energéticas do animal, com grande importância biológica, funcionando como reserva e tendo funções estruturais e protetoras. Entretanto, para Vasconcelos (1997), os altos teores de lípideos na ração podem causar efeitos deletérios sobre os

micro-organismos ruminais, principalmente em ovinos, nos quais esses efeitos são mais pronunciados, podendo afetar a digestão da fibra.

Segundo Sniffen et al. (1992), os alimentos utilizados para ruminantes devem ser fracionados para sua adequada avaliação. Os carboidratos totais nos alimentos são classificados nas frações (A, B1, B2 e C). Cada fração corresponde a porção digestível da parede celular, que possui uma taxa de degradação variável, sendo dependente do período de permanência da parede celular ao longo tempo no trato gastrointestinal.

Os teores médios dos carboidratos totais das dietas apresentaram diferenças aos níveis de 50 e 30% de caatinga. Verifica-se que a dieta D1 e D5 apresentaram os melhores teores de carboidratos totais (728 e 719 gkg MS respectivamente), entre as dietas testadas ao nível de 50 e 30%. Entretanto, as suas concentrações foram condizentes com os valores obtidos para proteína bruna das dietas referidas.

Gonzaga Neto et al. (2001), avaliaram a composição química, consumo e digestibilidade *in vivo* de dietas com diferentes níveis de feno de catingueira, fornecidas para Ovinos Morada Nova, verificaram que, o feno da catingueira apresentou valor nutritivo adequado, com adição de 50%, contudo, a concentração dos carboidratos totais foi superior (800 gkg MS) ao obtido nesta pesquisa. Os mesmos autores observaram que a adição do feno de catingueira diminui a digestibilidade dos constituintes das frações fibrosas.

Para Van Soest (1994), o conteúdo de carboidratos totais nas dietas é igualmente avaliado de acordo com as características anatômicas dos vegetais e do conteúdo celular. No entanto, os alimentos produzidos sob condições tropicais apresentam composição nutricional diferente dos alimentos obtidos em regiões de clima temperado. Consultando a literatura, nota-se que existem poucos dados sobre a caracterização das frações que constituem os carboidratos totais dos alimentos obtidos sob condições tropicais (MALAFAIA et al., 2004).

Quanto aos teores dos compostos fenólicos, as dietas diferiram entre si ($P < 0,05$) aos níveis de 50 e 30 % de caatinga. A dieta D1 apresentou os maiores teores de FT e TT e na dieta D4 foram menores, em relação ao nível de 50%. Por outro lado, ao nível de 30 % as dietas D8 e D6 foram superiores a dieta D7 para (FT e TT, respectivamente). Em relação às concentrações dos TC, observa-se que aos níveis de 50 e 30% as dietas D1 e D5 apresentaram teores divergentes, sendo constituídas das mesmas leguminosas. Essa divergência pode ser devido às concentrações das leguminosas presentes nas dietas.

De maneira geral, as concentrações dos compostos fenólicos nas dietas em relação aos dois níveis, apresentaram teores de FT e TT menores aos obtidos na composição química das plantas forrageiras nativas e exótica, utilizadas para constituir as dietas experimentais (Tabela 4.2.4). No entanto, para o TC as suas concentrações nas dietas foram semelhantes aos resultados encontrados nas análises químicas. Estes resultados corroboram com a confecção das dietas constituídas conforme ao sistema CBL, foram adicionadas leguminosas e gramíneas com teores de compostos fenólicos diferenciados, onde influenciaram na redução dos teores em relação à composição original dos ingredientes para formulação das dietas.

Segundo a literatura, os valores de TC considerados seguros para ruminantes estão na faixa entre 30 a 40 eq-g leucocianidina Kg^{-1} MS (BARRY et al., 1986). Neste sentido, observamos que os valores encontrados neste estudo, das dietas constituídas por leguminosas nos dois níveis (50 e 30 % respectivamente), estão dentro da faixa observados pelos mesmos autores. Contudo, a utilização das leguminosas forrageiras com concentrações de TC diferentes, deverá considerar o gênero, espécie, solo e clima.

Aearts et al. (1999) afirmam que a concentração de TC acima 50 eq-g leucocianidina Kg^{-1} MS nas dietas pode influenciar negativamente na ingestão de alimentos. Entretanto, em uma menor concentração, os seus efeitos adversos não são evidenciados. No entanto, esses efeitos apresentam implicações na redução da palatabilidade e na taxa de digestão no rúmen, refletindo em uma menor utilização de nutrientes com baixa resposta na produtividade animal (MUELLER-HARVEY, 2006; WAGHORN, 2008).

4.3.2 Produção de gases e de metano

Os alimentos, quando consumidos pelos ruminantes, são transformados pelos micro-organismos ruminais. No entanto, esta transformação vai depender da variação existente na dieta e das condições do rúmen, onde os produtos finais gerados são resultados de uma maior participação de eventos nutricionais que ocorrem a partir dos compostos dietéticos no rúmen (SCHOFIELD, 2001).

Neste sentido, a quantidade de gás produzido em experimentos *in vitro*, equaciona de forma indireta os eventos ocorridos na fermentação ruminal com o particionamento de energia para produção de ATP, massa microbiana, AGCC, calor e gases (LONGO, 2007). Entretanto, a produção de gases (dióxido de carbono e metano) representa uma grande perda de energia ingerida do alimento. Devido a esse processo metabólico, a energia gerada deve atender as necessidades da microflora, sendo maximizada na fermentação com menores perdas energéticas, resultando em alta produção destes produtos finais, gerando melhoria na produtividade animal com maior eficiência alimentar (MCALLISTER et al., 1996).

Os dados de produção de gases (PG) em mL/g MS e de metano CH₄ em mL/g MS das dietas experimentais com base no sistema de produção CBL por 24 h de incubação encontram-se na (Tabela 4.3.2). Observa-se que as dietas D1 e D3 apresentaram respectivamente a maior (166 mL/g MS) e a menor (151 mL/g MS) concentração para produção de gases acumulados ($P < 0,05$) ao nível de 50%. No entanto, as dietas constituídas ao nível de 30%, não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) e produziram em média 140 mL/gMS.

Evidenciamos neste estudo que as concentrações de gases nas dietas não sofreram redução em relação à concentração dos compostos fenólicos. Como era esperado, a presença de taninos pode reduzir à produção de gases e a degradabilidade, devido à complexação de taninos e proteína em pH ruminal (KUMAR; D'MELLO, 1995). Contudo, as concentrações de taninos e compostos fenólicos agiram de modos diferentes, particionando sobre a fermentação ruminal.

Estudos recentes têm verificado que a utilização de forrageiras com presença moderada de taninos condensados vem sendo reportado pela literatura (WOODARD et al., 2001; PUCHALA et al., 2005) com resultados bastante promissores, indicando efeito deletério do tanino condensados sobre as bactérias metanogênicas.

Tavendale et. al. (2005), trabalhando com o crescimento de culturas puras, foram os primeiros a demonstrar que o efeito inibidor dos taninos sobre as metonogênicas foi eficiente, utilizando extrato de TC de *Lotus pedunculatus*, observaram que o baixo peso molecular dos taninos foi muito mais efetivo em relação aos taninos com alto peso molecular, devido à facilidade de complexação com enzimas microbianas.

Tabela 4.3.2 - Produção de gases (mL/g MS) e CH₄ (mL/g MS) na fermentação *in vitro* de dietas experimentais com base no sistema de produção CBL por 24 h de incubação

Dietas	Parâmetros			
	Gás(mL/g MS)	CH ₄ (mL/g MS)	CH ₄ :Gás (mL/100 mL)	CH ₄ (mL/g MOVD)
D1	166 ^b	8,17 ^c	6,70 ^b	19,40 ^a
D2	130 ^{ab}	11,53 ^{ab}	9,02 ^a	21,43 ^a
D3	151 ^a	13,66 ^a	8,99 ^a	31,64 ^a
D4	141 ^{ab}	10,94 ^b	7,75 ^{ab}	20,35 ^a
D5	128 ^{ab}	10,94 ^c	8,49 ^{ab}	25,02 ^a
D6	139 ^{ab}	11,75 ^{ab}	8,53 ^{ab}	27,13 ^a
D7	153 ^a	13,13 ^{ab}	8,54 ^{ab}	27,10 ^a
D8	142 ^{ab}	12,46 ^{ab}	8,75 ^{ab}	28,47 ^a
EPM	6,46	0,85	0,51	3,72

Dieta1 (50% aroeira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 2 (50% catingueira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 3 (50% jureminha + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 4 (50% aroeira, cating, jurem. + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta5 (30% aroeira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 6 (30% catingueira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 7 (30% jureminha + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 8 (30% aroeira, cating., jurem. + 50% capim-buffel + 20% leucena).

^{A,B,C}medias seguida de mesma letra minúscula na coluna por tratamanto (dieta), não diferem entre si pelos teste de Tukey (P>0,05), NS Não Significativo.

EPM erro padrão da média

O gás metano possui reconhecidamente um importante papel como intensificador do efeito estufa. Os ruminantes são reconhecidos como importantes emissores de metano ruminal para atmosfera, pelo seu processo digestivo de fermentação entérica. Os animais consomem dietas de baixa qualidade, podem produzir mais metano por unidade de produtos (carne e leite) em relação aos animais de alta produção consumindo dietas de melhor qualidade em maiores níveis de ingestão. Resultados têm mostrado que a produção e a redução de metano pela pecuária estão ligadas à melhoria da dieta, à melhoria dos pastos, à suplementação alimentar, à seleção por maior potencial genético de produção e a outras medidas que reflitam na melhor eficiência produtiva, resultando em menores ciclos de produção (PEDREIRA et al., 2005).

A produção acumulada de metano mL/g MS (Tabela 4.3.2) apresentou ao nível de 50% diferenças estatísticas entre as dietas testadas. Incubação da dieta D3 resultou em 13 mL/g MS, seguida da dieta D4 e da dieta D1 em menor concentração (10 e 8 respectivamente). Ao nível de 30%, a dieta D5 apresentou uma concentração menor ($P < 0,05$) em relação às demais. Entretanto, quando expresso em CH_4 : Gás (mL/100 mL), observamos que ao nível de 50% as dietas D2 e D3 foram maiores ($P < 0,05$), em relação a dieta D1 ($P < 0,05$). Porém, ao nível de 30% todas as dietas não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) entre si.

Quando comparamos as dietas (tratamentos) aos níveis de 50 e 30% observamos eficácia na redução da produção de CH_4 (mL/g MS), devido às variabilidades das concentrações dos compostos fenólicos presentes neste estudo. A proporção de cada leguminosa contida nas dietas sugere que houve atuação direta dos taninos, em especial o TC, na inibição direta no metabolismo das metanogênicas (TAVENDALE et al., 2005).

É de consenso na literatura a utilização crescente de leguminosas forrageiras taniníferas com objetivo em mitigação de metano *in vitro* (TAVENDALE et al., 2005) ou *in vivo* (WOODWARD et al., 2001; PUCHALA et al., 2005). No entanto, o mecanismo de ação ainda é desconhecido ou pouco estudado em leguminosas nativas tropicais.

Segundo Bhatta et al. (2002), os taninos são considerados fatores antinutricionais em baixas concentrações, podendo alterar a fermentação ruminal e a síntese de proteína microbiana (BHATTA et al., 2001), reduzindo a produção de CH₄ ruminal quando incluídas como leguminosas temperadas (WAGHORN et al., 2002) ou como extratos purificados de taninos. No entanto, Beauchemin et. al. (2007), trabalhando com bovinos de corte alimentados com dietas com uma suplementação com 18 g/kg MS TC de extrato de quebracho, relataram que não houve efeito sobre CH₄ ruminal ou sobre a digestibilidade de MS.

Longo (2007), trabalhando com quatro leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico, observou que em todas as plantas testadas houve redução de metano. No entanto, somente a *Leucaena leucocephala* e a *Stylobium aterrimum* demonstraram ser capazes de contribuir com maior produção animal com melhor eficiência. Apesar das outras leguminosas serem eficientes na redução, as proporções de outros parâmetros ruminais influenciaram nas rotas de fermentação.

4.3.3 Degradabilidade e fator de partição

Nas tabelas (4.3.3) são apresentados os valores de degradabilidade (g/kg MS) e fator de partição (mL/mg MOVD). Como se pode observar, os parâmetros não apresentaram diferenças ($P>0,05$), portanto, não devendo haver diferenças também entre os demais dados que são calculados a partir desses parâmetros.

Tabela 4.3.3 - Degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS g/Kg MS), matéria orgânica (DVMO g/Kg MS) e fator de partição (FP mL/mg MOD) na fermentação *in vitro* de dietas experimentais por 24 h de incubação

Dietas	Parâmetros		
	DVMS (g/Kg MS)	DVMO (g/Kg MS)	FP(mL/mgMOD)
D1	417 ^a	504 ^a	3,79 ^a
D2	569 ^a	589 ^a	4,00 ^a
D3	454 ^a	475 ^a	2,63 ^a
D4	492 ^a	579 ^a	3,51 ^a
D5	430 ^a	477 ^a	3,20 ^a
D6	415 ^a	475 ^a	2,94 ^a
D7	471 ^a	537 ^a	2,95 ^a
D8	478 ^a	528 ^a	3,17 ^a
EPM	22,37	38,18	0,32

Dieta1 (50% aroeira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 2 (50% catingueira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 3 (50% jureminha + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 4 (50% aroeira, cating, jurem. + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta5 (30% aroeira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 6 (30% catingueira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 7 (30% jureminha + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 8 (30% aroeira, cating., jurem. + 50% capim-buffel + 20% leucena).

^{A,B} médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna por tratamento (dieta), não diferem entre si pelos teste de Tukey (P>0,05)

EPM erro padrão da média

4.3.4 Parâmetros de fermentação

Os parâmetros de fermentação são apresentados na (Tabela 4.4.4), observa-se que não houve diferenças (P>0,05) entre as dietas testadas aos níveis de 50 e 30%. Contudo, a concentração média de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no líquido ruminal após 24 h, aos níveis de 50 e 30%, foram 35 e 41 mg/100 mL respectivamente e o pH médio para ambos os níveis foi de 6,8. Embora as dietas não tenham diferido entre si, apresentaram concentrações superiores às encontradas na literatura. Segundo Van Soest (1994), 5 a 10 mg/100 mL seriam respectivamente as concentrações mínimas necessárias para permitir adequada fermentação microbiana no rumen.

Tabela 4.3.4 - Nitrogênio amoniacal (N-NH₃), pH, contagem de protozoários (x10⁵/mL) e a síntese de nitrogênio microbiano (NM) na fermentação *in vitro* de dietas experimentais por 24 h de incubação

Dietas	Parâmetros			
	N-NH ₃	pH	Prot. (x10 ⁵ /mL)	NM
D1	32,20 ^a	6,91 ^a	6,20 ^a	19,86 ^a
D2	40,01 ^a	6,84 ^a	7,20 ^a	19,99 ^a
D3	45,73 ^a	6,86 ^a	7,20 ^a	18,13 ^a
D4	35,70 ^a	6,88 ^a	6,05 ^a	20,40 ^a
D5	38,50 ^a	6,86 ^a	5,71 ^a	20,08 ^a
D6	44,92 ^a	6,85 ^a	8,05 ^a	21,46 ^a
D7	42,35 ^a	6,86 ^a	3,65 ^a	16,70 ^a
D8	39,78 ^a	6,88 ^a	8,20 ^a	21,58 ^a
EPM	2,37	0,03	1,40	2,95

Dieta1 (50% aroeira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 2 (50% catingueira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 3 (50% jureminha + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 4 (50% aroeira, cating, jurem. + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta5 (30% aroeira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 6 (30% catingueira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 7 (30% jureminha + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 8 (30% aroeira, cating., jurem. + 50% capim-buffel + 20% leucena).

^{A,B} medias seguida de mesma letra minúscula na coluna por tratamanto (dieta), não diferem entre si pelos teste de Tukey (P>0,05)

EPM erro padrão das médias

4.3.5 Concentração Molar dos Ácidos Graxos de Cadeia Curta

A concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), as proporções molares do acetato, propionato, butirato, Isobutirato, Isovalerato, Valerato e relação acetato:propionato após 24 h de incubação estão apresentados na Tabela 4.3.5. Observa-se que, as concentrações totais de AGCC apresentaram diferenças (P<0,05) ao nível de 50% entre as dietas testadas. Dieta D1 resultou em maior concentração seguida dieta D4 em menor concentração (73 e 57 respectivamente). Por outro lado, ao nível de 30% as concentrações totais de AGCC foram semelhantes resultando em menor valor a dieta D8.

Quanto às proporções molares de acetato, as dietas apresentaram diferenças (P<0,05) aos níveis de 50 e 30%. A dieta D1 apresentou maior teor de acetado (42 mmol/L) enquanto que a dieta D7 apresentou (43 mmol/L).

De maneira geral, observa-se que os valores obtidos para concentrações molares de acetato, propionato e butirato estão dentro de uma margem aceitável, aos observados na literatura. Segundo Coelho da Silva e Leão (1979), as variações nas proporções individuais foram: acetato 54% a 74%, propionato 16% a 27%, butirato 6% a 15% do total de AGCC produzidos no rúmen.

Tabela 4.3.5 - Concentração (mmol/L) de ácidos graxos voláteis (AGCC) e a relação acetato: propionato nas dietas experimentais incubada por 24 h pela técnica de produção de gases *in vitro*

Parâmetros	Dietas								EPM
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
AGCC, mM									
Total	73,92 ^a	69,79 ^{ab}	65,48 ^{ab}	56,35 ^b	65,35 ^{ab}	63,74 ^{ab}	69,85 ^{ab}	54,58 ^b	6,22
Acetato	42,81 ^a	40,07 ^{ab}	37,87 ^{abc}	29,11 ^{bc}	36,70 ^{abc}	35,80 ^{abc}	43,58 ^a	26,03 ^c	5,58
Propionato	9,58 ^a	9,55 ^a	9,90 ^a	6,74 ^a	7,52 ^a	7,75 ^a	9,35 ^a	7,91 ^a	1,51
Butirato	7,55 ^a	6,41 ^a	6,82 ^a	5,67 ^a	6,28 ^a	7,35 ^a	8,44 ^a	5,60 ^a	1,54
Isobutirato	4,55 ^a	4,33 ^a	4,33 ^a	5,01 ^a	4,56 ^a	3,90 ^a	2,90 ^a	6,97 ^a	1,04
Isovalerato	4,85 ^a	4,25 ^a	2,90 ^a	4,41 ^a	3,24 ^a	2,45 ^a	2,06 ^a	2,88 ^a	1,04
Valerato	4,86 ^a	5,16 ^a	3,64 ^a	6,00 ^a	7,04 ^a	6,46 ^a	33,50 ^a	5,20 ^a	1,46
C ₂ :C ₃	4,61 ^{ab}	4,25 ^{ab}	3,93 ^{ab}	4,41 ^{ab}	5,11 ^a	4,67 ^{ab}	5,01 ^a	3,21 ^b	0,25

Dieta1 (50% aroeira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 2 (50% catingueira + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 3 (50% jureminha + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta 4 (50% aroeira, cating, jurem. + 25% capim-buffel + 25% leucena); Dieta5 (30% aroeira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 6 (30% catingueira + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 7 (30% jureminha + 50% capim-buffel + 20% leucena); Dieta 8 (30% aroeira, cating., jurem. + 50% capim-buffel + 20% leucena).

A,B,C medias seguida de mesma letra minúscula na linha por tratamanto (dieta), não diferem entre si pelos teste de Tukey (P>0,05)

EPM erro padrão das médias

Beuvink e Spoelstra (1992) reportam que a relação propionato/acetato pode interferir no volume de gases produzidos, onde uma maior produção de acetato favorece a produção de gases. Existe uma interação entre os ácidos graxos voláteis e o meio de cultura (tampão), em que o decréscimo no pH favorece a produção de gases. Todavia, neste experimento é possível observar que a presença dos produtos de degradação (AGCC) dos materiais estudados não interferiu na relação entre a degradação e produção de gases.

4.4 Conclusões

Em geral, as dietas constituídas por leguminosas com base no sistema de produção CBL, apresentaram na sua composição química elevados teores de proteína bruta com baixa concentração de compostos fenólicos em especial para taninos condensados, qualificando as dietas como alto potencial para nutrição dos pequenos ruminantes. Ao serem avaliadas pela técnica de produção de gases *in vitro*, as dietas apresentaram redução da emissão de metano dentro de cada nível. No entanto, os parâmetros fermentativos (degradabilidade, produção de amônia e a síntese nitrogênio microbiano pela incorporação de ^{15}N) sugeram que houve alterações das rotas de fermentação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de leguminosas nativas da caatinga constitui uma alternativa na região semiárida, principalmente por apresentar características favoráveis como: valor nutricional, potencial produtivo e rusticidade. No entanto, a viabilidade, no ponto de vista nutricional da utilização de algumas espécies pode ser limitante, devido a alta concentração de compostos fenólicos, em especial, os taninos condensados, como ficou caracterizado neste trabalho em algumas leguminosas testadas.

As dietas constituídas pelas leguminosas com base no sistema de produção CBL (Caatinga + Capim-buffel + Leucena), em níveis crescentes de Caatinga, reduziram a concentração de CH₄. Porém, as fermentações ruminais foram moduladas de acordo com a concentração de cada nível .

Estudos sobre a forma de utilização de leguminosas taniníferas nos sistemas produtivos devem ser criteriosos na avaliação de manejo e utilização das espécies arbóreo-arbustivas. Para isto, é necessária uma maior difusão de tecnologia desenvolvida dentro dos órgãos de pesquisas federais e estaduais, para que o homem do campo tenha acesso ao que está sendo desenvolvido e possa por em prática.

REFERÊNCIAS

- AERTS, R. J.; BARRY, T. N.; MCNABB, W. C. Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 75, p. 1–12, 1999.
- ARAUJO, R. C.; PIRES, A. V.; MOURÃO, G. B.; ABDALLA, A. L.; SALLAM, S. M. A. Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 166-167, p. 155-162, 2011.
- ARAÚJO, G. G. L. de; MOREIRA, J. N.; FERREIRA, M. de A.; TURCO, S. H. N.; SOCORREO, E. P. Consumo voluntário e desempenho de ovinos submetidos a dietas contendo diferentes níveis de feno de maniçoba. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 1, p. 123-130, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC**. 16. ed. Arlington: AOAC International, 1995. v. 1, p. 1-30.
- BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-46.
- BEAUCHEMIN, K. A.; MCGINN, S. M.; MARTINSNEZ, T. F.; MACALLISTER, T. A. Use of condensed tannin extract from quebracho tree to reduce methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 85, p. 1990-1996, 2007.
- BEUVINK, J. M. W.; SPOELSTRA, S. F. Interactions between substrate, fermentation end products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 37, p. 505-509, 1992.
- BLÜMMEL, M.; STEINGASS, H.; BECKER, K. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 77, p. 911–921, 1997.
- BHATTA R.; KRISHNAMOORTHY U.; MOHAMMED F. Effect of tamarind (*Tamarindus indica*) seed husk tannins on *in vitro* rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 90, p. 143–152, 2001.
- BHATTA, R.; SHINDE, A. K.; VAITHIYANATHAN, S.; SANKHYAN, S. K.; VERMA, D. L. Effect of polyethylene glycol-6000 on nutrient intake, digestion and growth of kids browsing *Prosopis cineraria*. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 101, p. 45–54, 2002.
- BUENO, I. Q. S.; FILHO, S. L. S.; GOBBO, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. S. S.; ABDALL, A. L. Influence of inoculum source in gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 123-124, p. 95-105, 2005.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Ed. Livroceres, 1979. 384 p.

COTTYN, B. G.; BOUCQUE, C. V. Rapid method for the gas- chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 16, n. 1, p. 105-107, 1968.

FILÍPEK, J.; DVORAK, R. Determination of the volatile fatty acid content in the rumen liquid: comparison of gas chromatography and capillary isotachopheresis. **Acta Veterinaria Brno**, Brno, v. 78, n.4 p. 627-633, 2009.

GONZAGA NETO, S.; BATISTA, A. M. V.; CARVALHO, F. R. R.; MARQUES, C. A. T.; SANTOS, G. A. R. Composição química, consumo e digestibilidade *in vivo* de dietas com diferentes níveis de feno de catingueira (*Caesalpinea bracteosa*) fornecida para ovinos Morada Nova. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 553-562, 2001.

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

LONGO, C. **Avaliação in vitro de leguminosas taniníferas tropicais para miticação de metano enterico**. 2007. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LONGO, C.; BUENO, I. C. S.; NOZELLA, E. F.; GODOY, P. B.; CABRAL FILHO, S. L. S.; ABDALLA, A. L. The influence os head space and inoculums dilution on vitro ruminal methane measuments. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1223, p. 62-65, 2006.

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

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

MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; VIEIRA, R. A. M.; SILVA, J. F. C.; PEREIRA, J. C. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 27, p. 370-380, 2004.

MERTENS, K. H.; STEINGASS, H. Gravimetric determination of amylase-treated detergent fiber in feeds using refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of the AOAC Interncional**, Arlington, v. 85, p. 1217-1240, 2002.

MCALLISTER, A. T.; OKINE, E. K.; MATHISON, G. W.; CHENG, K. J. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 231-243, 1996.

MUELLER-HARVEY, I. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, p. 2010–2037, 2006.

PEDREIRA, M. S.; OLIVEIRA, S. G.; BERCHIELLI, T. T. PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 3, p. 24-32, 2005.

PEREIRA E. S.; ARRUDA, A. M. V.; MIRANDA, L. F.; MIZUBUTI, I. Y.; MUNIZ, B. E.; PINTO, A. P. Importância da inter-relação carboidrato e proteína em dietas de ruminante. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 125-134, 2005.

PUCHALA, R.; MIN, B. R.; GOETSCH, A. L.; SAHLU, T. The effect of a condensed tannin-containing forage on methane emission by goats. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 83, p. 182–186, 2005.

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**. Versão 9.1. Cary, NC: SAS Institute, 2009.

SERRANO, R. D. C.; SIERRA, L. M. P. Quantification techniques of the protein microbial synthesis in rumen: a review. **Resvista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia**, Medellin, v. 6, n. 1, p. 46-53, 2010.

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.

SNIFFER, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOES, P. J.; FOX, D. G.; RUSSELL, J. B. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**. Albany, v. 70, p. 3562-3577, 1992.

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

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

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

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

VITTI, D. M. S. S.; NOZELLA, E. F.; ABDALLA, A. L.; BUENO, I. C. S.; SILVA FILHO, J. C.; COSTA, C.; BUENO, M. S.; LONGO, C.; VIEIRA, M. E. Q.; CABRAL

FILHO, S. L. S.; GODOY, P. B.; MUELLER-HARVEY, I. The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 122, p. 123-133, 2005.

WAGHORN, G. C. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production – progress and challenges. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 147, p. 116–139, 2008.

WAGHORN, G. C.; TAVENDALE, M. H.; WOODFIELD, D. R. Methanogenesis from forages fed to sheep. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, Lincoln, v. 64, p. 167–171, 2002.

WANG, Y.; MCALLISTER, T. A.; YANKE, L. J.; XU, Z. J.; CHEEKE, P. R.; CHENG, K. J. *In vitro* effects of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on rumen microbial protein synthesis and ruminal fermentation. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, p. 2114-2122, 2000.

WOODWARD, S. L.; WAGHORN, G. C.; ULYATT, M. T.; LASSEY, K. R. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Palmerston North, New Zealand, v. 61, p. 23-26, 2001.